

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS

Ana Bárbara Polo

**Caracterização físico-química e atividade antimicrobiana de formulação de filmes poliméricos
à base de quitosana com óleo-resina de alecrim para o manejo de queimaduras**

Juiz de Fora

2023

Ana Bárbara Polo

**Caracterização físico-química e atividade antimicrobiana de formulação de filmes poliméricos
à base de quitosana com óleo-resina de alecrim para o manejo de queimaduras**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de
concentração: Imunologia e Doenças Infecto-parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri

Coorientadora: Prof. Dra. Ana Carolina Morais Apolônio

Juiz de Fora

2023

Polo, Ana Bárbara.

Caracterização físico-química e atividade antimicrobiana de
formulação de filmes poliméricos à base de quitosana com
óleo-resina de alecrim para o manejo de queimaduras / Ana Bárbara
Polo. -- 2023.

86 p. : il.

Orientador: Rodrigo Luiz Fabri

Coorientadora: Ana Carolina Morais Apolônio

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz
de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética,
2023.

1. Lesões na pele. 2. Filmes tópicos. 3. Biopolímeros. 4. Alecrim.
5. Atividades biológicas. I. Fabri, Rodrigo Luiz, orient. II. Morais
Apolônio, Ana Carolina, coorient. III. Título.

Ana Bárbara Polo

Caracterização físico-química e atividade antimicrobiana de formulação de filmes poliméricos à base de quitosana com óleo-resina de alecrim para o manejo de queimaduras

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciências Biológicas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Imunologia e
Doenças
Infectoparasitárias.

Aprovada em 10 de janeiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri - orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Morais Apolônio - coorientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Ari Sérgio de Oliveira Lemos
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Martha Eunice de Bessa
Centro Universitário UniAcademia - Juiz de Fora - MG



Documento assinado eletronicamente por Rodrigo Luiz Fabri, Professor(a), em 10/01/2024, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Martha Eunice de Bessa, Usuário Externo, em 11/01/2024, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Ana Carolina Morais Apolonio, Professor(a), em 11/01/2024, às 13:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Ari Sérgio de Oliveira Lemos, Usuário Externo, em 11/01/2024, às 20:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 1634479 e o código CRC 73804F0E.

RESUMO

As queimaduras constituem um problema de saúde pública mundial, representando uma das principais causas de morbidade, gerando baixa qualidade de vida do acometido, desfiguração e até mesmo incapacidade. É o quarto problema mais comum causado por trauma no mundo, chegando até a 180.000 mortes por ano. Sua classificação se dá em graus, sendo que quanto maior o grau, maior a gravidade associada. Um problema muito comum associado às queimaduras são as infecções secundárias. Estas ainda representam cerca de 61% das causas de óbito em queimados, mesmo após melhora terapêutica ao longo dos anos. As infecções secundárias apresentam alguns microrganismos-chave no processo infeccioso, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. No entanto, muito ainda precisa ser feito para melhorar o tratamento das queimaduras, visto que as vítimas de queimaduras apresentam imunossupressão, baixa capacidade de absorção de antimicrobiano no tecido, além de poderem apresentar microrganismos multirresistentes como colonizadores das lesões, culminando na falha do tratamento. A quitosana é um biopolímero interessante em relação às suas propriedades, apresentando boa aderência, ausência de citotoxicidade, atividade antimicrobiana e cicatrizante. Paralelamente, a óleo-resina de alecrim (ORA) também possui atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes interessantes. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi formular um filme polimérico à base de quitosana com ORA em diferentes concentrações visando o controle das infecções secundárias em lesões por queimadura. Primeiramente foi avaliada atividade antibacteriana da ORA frente a um *screening*, por meio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM), tendo a mesma apresentado bom desempenho e atividade bacteriostática para todas as espécies testadas. Posteriormente foram realizados teste de cinética de morte para duas estirpes de *S. aureus*, nos quais foi possível verificar que a ORA atrasa a fase log de *S. aureus* por, pelo menos, 6 horas. Entretanto, após 24 horas as bactérias voltaram a crescer, o que confirma a ação bacteriostática observada no CMM. Em relação aos filmes formulados, foram obtidos filmes homogêneos em relação à mistura de seus constituintes, mas com presença de irregularidades nas suas superfícies, variando de acordo com a concentração de ORA e a temperatura

de secagem utilizada. Os filmes também foram avaliados em relação aos parâmetros de qualidade peso médio, espessura, umidade, intumescimento e solubilidade, apresentando características adequadas para um futuro filme curativo. A análise de espectroscopia Raman e FT-IR permitiram a avaliação das interações moleculares entre os constituintes da formulação, além da identificação de grupos funcionais deles, como regiões correspondentes a ligações C-O presentes em álcoois e fenóis, assim como regiões de O-H referentes às ligações de hidrogênio. Por fim, a atividade antibacteriana dos filmes pela técnica de disco-difusão demonstrou atividade para as espécies testadas, embora em uma menor escala do que o controle de atividade iodopolividona a 10%. Assim, conclui-se que foi possível obter uma formulação de filme à base de quitosana e ORA, apresentando estes potenciais promissores no manejo de queimaduras considerando o controle das infecções secundárias e a necessidade da constante pesquisa para desenvolvimento de formulações tópicas bioativas que sejam mais eficazes para o paciente.

Palavras-chave: Lesões na pele; Filmes tópicos; Biopolímeros; Alecrim; Atividades biológicas.

ABSTRACT

Burns constitute a global public health problem, representing one of the main causes of morbidity, generating low quality of life for those affected, disfigurement and even disability. It is the fourth most common problem caused by trauma in the world, accounting for up to 180,000 deaths per year. It is classified in degrees, with the higher the degree, the greater the associated severity. A very common problem associated with burns is secondary infections. These still represent around 61% of the causes of death in burns, even after therapeutic improvements over the years. Secondary infections present some key microorganisms in the infectious process, such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. However, much still needs to be done to improve the treatment of burns, as burn victims present immunosuppression, low capacity for absorption of antimicrobials in the tissue, in addition to being able to present multi-resistant microorganisms as colonizers of the lesions, resulting in treatment failure. Chitosan is an interesting biopolymer in relation to its properties, presenting good adhesion, absence of cytotoxicity, antimicrobial and healing activity. At the same time, rosemary oleoresin (ORA) also has interesting antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activities. Therefore, the objective of the present work was to formulate a polymeric film based on chitosan with ORA in different concentrations aiming to control secondary infections in burn injuries. First, the antibacterial activity of ORA was evaluated against screening, using Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Microbicidal Concentration (MMC), which showed good performance and bacteriostatic activity for all species tested. Subsequently, death kinetic tests were carried out for two strains of *S. aureus*, in which it was possible to verify that ORA delays the log phase of *S. aureus* for at least 6 hours. However, after 24 hours the bacteria grew again, which confirms the bacteriostatic action observed in MMC. Regarding the formulated films, homogeneous films were obtained in relation to the mixture of their constituents, but with the presence of irregularities on their surfaces, varying according to the concentration of ORA and the drying temperature used. The films were also evaluated in relation to quality parameters: average weight, thickness, humidity, swelling and solubility, presenting suitable characteristics for a future healing film. Raman and FT-IR spectroscopy analysis allowed the evaluation of molecular interactions between the constituents of the formulation, in addition to

the identification of their functional groups, such as regions corresponding to C-O bonds present in alcohols and phenols, as well as O-H regions referring to C-O bonds. hydrogen. Finally, the antibacterial activity of the films using the disk diffusion technique demonstrated activity for the species tested, although on a smaller scale than the polyvidone iodine (10%) activity control. Thus, it is concluded that it was possible to obtain a film formulation based on chitosan and ORA, presenting promising potential in the management of burns considering the control of secondary infections and the need for constant research to develop bioactive topical formulations that are more effective for the patient.

Keywords: Skin injuries; Topical films; Biopolymers; Rosemary; Biological activities.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Graus de lesões em queimaduras.

Figura 2 – Estrutura química da quitina e seu derivado, quitosana.

Figura 3 – Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.).

Figura 4 – Fluxograma do processo de formulação dos filmes.

Figura 5 – Valores de CIM da ORA frente aos microrganismos testados.

Figura 6 – Valores de CIM e CBM da quitosana frente aos microrganismos testados.

Figura 7 – Gráfico da curva de morte para *S. aureus* MRSA ATCC 33591, na presença

de diferentes concentrações de ORA. Estão apresentados também o controle de crescimento e o controle de atividade azitromicina (0,4 mg/ml).

Figura 8 – Gráfico da curva de morte para *S. aureus* sensível ATCC 25904 na presença de diferentes concentrações de ORA. Estão apresentados também o controle de crescimento e o controle de atividade azitromicina (0,006 mg/mL).

Figura 9 – Formulações F1 laminada – à esquerda e F2 laminada – à direita.

Figura 10 – Formulação F2 em placa de petri.

Figura 11 – Formulação F3.

Figura 12 – Formulação F4.

Figura 13 – Formulação F5.

Figura 14 – Soluções precursoras dos filmes da F4.

Figura 15 – Gotículas de ORA na borda do filme 1,0% ORA da F4.

Figura 16 – Recorte da F5 evidenciando suas irregularidades.

Figura 17 – Teor de umidade das formulações F3, F4 e F5.

Figura 18 – Porcentagem de intumescimento dos filmes ao longo do tempo e solubilidade da F3.

Figura 19 – Porcentagem de intumescimento dos filmes ao longo do tempo e solubilidade da F4.

Figura 20 – Porcentagem de intumescimento dos filmes ao longo do tempo e solubilidade da F5.

Figura 21 – Filmes após 24 h submersos em fluido simulador de feridas para o teste de intumescimento.

Figura 22 – Filmes após processo de secagem para o teste de solubilidade.

Figura 23 – Espectros do FT-IR dos filmes da F3 e de seus constituintes ORA e quitosana.

Figura 24 – Espectros de FT-IR dos filmes da F3 e de seus constituintes ORA e quitosana sobrepostos.

Figura 25 – Espectros RAMAN dos filmes da F3 e de seus constituintes ORA, quitosana e Tween 80.

Figura 26 – Espectros RAMAN dos filmes da F3 e de seus constituintes ORA, quitosana e Tween 80 sobrepostos.

Figura 27 – Valores de halo de inibição dos filmes formulados e controles para *A. baumannii* ATCC 19606.

Figura 28 –Valores de halo de inibição dos filmes formulados e controles para *P. aeruginosa* INCQS 2742.

Figura 29 – Valores de halo de inibição dos filmes formulados e controles para *S. aureus* 33591 (MRSA).

Figura 30 – Placas do ensaio de disco-difusão com a F5 e com as soluções de ORA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de óbitos por queimaduras e taxas de mortalidade, segundo causa específica de 2015 a 2020.

Tabela 2 – Concentrações de ORA presente nas diferentes formulações.

Tabela 3 – PZ e DHm das soluções precursoras dos filmes referente à F4.

Tabela 4 – Valores de peso médio e espessura da F3.

Tabela 5 – Valores de peso médio e espessura da F4.

Tabela 6 – Valores de peso médio e espessura da F5.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	do inglês American Type Culture Collection
ATR	do inglês Attenuated Total Reflection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMC	Carboximetilcelulose
CMM	Concentração Microbicida Mínima
DHm	Diâmetro Hidrodinâmico Médio
DLS	do inglês Dynamic Light Scattering
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
F1	Formulação 1
F2	Formulação 2
F3	Formulação 3
F4	Formulação 4
F5	Formulação 5
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Fourier
IL-2	Interleucina-2
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
KBr	Brometo de potássio
KCl	Cloreto de potássio
L.	Lamiaceae
LPS	Lipopolissacarídeo
LTDA	Limitada
M100	Padrões de desempenho para testes de suscetibilidade antimicrobiana (CLSI)
MDR	Multidrogas-resistente
MH	Mueller-Hinton
MHA	Mueller-Hinton Ágar
MRSA	do inglês <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monossódico
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
OEA	Óleo essencial de alecrim

OMS	Organização Mundial da Saúde
ORA	Óleo-resina de alecrim
OS	Peso após secagem (teste solubilidade)
P0	Peso inicial (teste intumescimento e solubilidade)
Pf	Peso final
Pi	Peso inicial (teste umidade)
PI	Peso intumescido
PVA	Álcool polivinílico
PZ	Potencial Zeta
RNA _m	RNA mensageiro
SBQ	Sociedade Brasileira de Queimaduras
SDMO	Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SUS	Sistema Único de Saúde
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 QUEIMADURAS.....	16
2.2 INFECÇÕES SECUNDÁRIAS EM QUEIMADURAS.....	19
2.3 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA INFECÇÕES SECUNDÁRIAS EM QUEIMADURAS.....	21
2.4 FILMES POLIMÉRICOS.....	22
2.5 QUITOSANA.....	25
2.6 ALECRIM (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	27
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4. METODOLOGIA.....	31
4.1 OBTENÇÃO DA ORA.....	31
4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBANA DE CONSTITUINTES DO FILME.....	31
4.2.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Microbicida Mínima (CMM) da ORA e da quitosana.....	31
4.2.2 Cinética de morte.....	32
4.3 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO DE FILMES À BASE DE QUITOSANA COM INCORPORAÇÃO DE ORA.....	33
4.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA (PZ) E DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO (DH_m) DAS PARTÍCULAS DAS SOLUÇÕES PRECURSORAS DOS FILMES.....	34
4.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DOS FILMES FORMULADOS.....	35
4.5.1 Avaliação da estabilidade dos filmes às diferentes temperaturas de secagem.....	35
4.5.2 Determinação do peso médio.....	35
4.5.3 Determinação da espessura.....	35
4.5.4 Determinação do teor de umidade.....	35
4.5.5 Determinação do grau de intumescimento.....	36

4.5.6	Determinação da solubilidade.....	36
4.6	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES POR	
	ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA VIBRACIONAL RAMAN E FT-IR.....	37
4.7	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS FILMES.....	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE	
	CONSTITUINTES DOS FILMES.....	38
5.1.1	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Microbicida Mínima (CMM) da ORA.....	38
5.1.2	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Microbicida Mínima (CMM) da quitosana.....	41
5.1.3	Cinética de morte.....	43
5.2	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES À BASE DE	
	QUITOSANA COM INCORPORAÇÃO DE ORA.....	45
5.2.1	Formulação dos filmes.....	46
5.2.2	Caracterização físico-química da solução precursora dos filmes pela	
	determinação do Potencial Zeta (PZ) e Diâmetro Hidrodinâmico médio	
	(DHm) das partículas.....	51
5.2.3	Avaliação dos parâmetros de qualidade dos filmes formulados.....	53
5.2.3.1	Avaliação da estabilidade dos filmes a diferentes temperaturas de secagem.....	53
5.2.3.2	Determinação do peso médio e espessura dos filmes.....	55
5.2.3.3	Determinação do teor de umidade.....	57
5.2.3.4	Determinação do grau de intumescimento e solubilidade.....	58
5.2.4	Caracterização físico-química dos filmes por espectroscopia Raman e	
	FT-IR.....	62
5.3	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS FILMES.....	68
6.	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	ANEXO I.....	84

1 INTRODUÇÃO

As queimaduras representam um problema significativo de saúde pública (OMS, 2023). Sua gravidade pode ser determinada pela profundidade da lesão e pela extensão da área afetada, incluindo lesões mais comuns, como a de primeiro grau, seguidas das de segundo, terceiro e em quadros mais graves, de quarto grau (Greenhalgh, D.G., 2019; Jeschke, M.G. *et al.*, 2020). Além de impactar a estética e o psicológico do paciente, as queimaduras podem levar à morte (Parvizi, A. *et al.*, 2023).

Considerando-se o espectro microbiano comumente associado às feridas por queimaduras, embora este seja diversificado, pode-se traçar um perfil ao longo da evolução clínica. Nos primeiros cinco dias existe um predomínio de espécies bacterianas Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e espécies do gênero *Streptococcus*, principalmente, seguido de colonização por bactérias Gram-negativas a partir do quinto dia, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*. Estas últimas estão associadas a maior morbimortalidade da infecção (Ladhani, H.A.; Yowler, C.J.; Claridge, J.A., 2021). Assim, para a terapêutica dessas condições, existem vários medicamentos no mercado. No entanto, muitos apresentam desvantagens, como a sulfadiazina de prata, que retarda a regeneração da pele (Greenhalgh, D.G., 2019) e a iodopolividona, que exibe alta toxicidade e leva ao aumento da dor (Moncrief, J.A., 1985). Entretanto, a problemática não se restringe diretamente à desvantagem da droga, mas está relacionada a outros fatores como alcance dos antimicrobianos em baixa concentração nos tecidos, e quando associada a uma imunossupressão, pode resultar em resistência bacteriana com consequente falha terapêutica (Patel, K. *et al.*, 2023).

Portanto, a prevenção e o controle de infecções em vítimas de queimaduras são desafios constantes durante o manejo de queimados. Dessa forma, o desenvolvimento de novas formulações para o tratamento dessas lesões, que aumentem a eficácia da terapia e resulte em uma melhor cicatrização devem ser alvos constantes de pesquisa. Nesse sentido, filmes poliméricos com atividades biológicas favoráveis podem ser promissores para o tratamento de lesões causadas por queimaduras.

Entre os inúmeros polímeros utilizados para a formulação desses filmes, a quitosana se destaca por ser um polissacarídeo natural, biodegradável, atóxico, biocompatível e que possui uma boa adesão. Além dessas características, este polímero é capaz de induzir a produção de citocinas, fibroblastos e colágeno tipo IV, levando também à ativação de macrófagos (Paul, P.; Kolesiyska, B.; Sujka, W., 2019). Alguns estudos mostram efeitos positivos na reepitelização da pele, diminuindo a formação de cicatrizes (Catanzano, O.; Boateng, J., 2015; Alemdaroglu, C. *et al.*, 2006). A quitosana também possui propriedades antimicrobianas (Cai-Ling, K. *et al.*, 2021), importantes para o controle de uma infecção.

A versatilidade da quitosana faz com que ela seja um polímero aplicado em várias formulações, e quando combinadas com outras substâncias de potencial farmacológico, é esperado que um sinergismo aconteça e que as atividades biológicas da formulação sejam aprimoradas. O uso de recursos vegetais no tratamento de algumas condições tem sido explorado pela população humana há milhares de anos (Sharma, A. *et al.*, 2021). Muitas espécies vegetais apresentam atividade anti-inflamatória, antioxidante, cicatrizante e antimicrobiana (Woollard, A.C.; Tatham, K.C.; Barker, S., 2007), importantes no tratamento das queimaduras.

Entre as espécies vegetais que apresentam propriedades biológicas interessantes para o tratamento dessas lesões, está o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), uma planta aromática pertencente à família Lamiaceae, de origem no Mediterrâneo, mas atualmente cultivado de forma ampla pelo mundo, sendo sua produção considerada de baixo custo (Mena, P. *et al.*, 2016). Suas atividades biológicas são decorrentes de sua complexa e variada composição química, podendo variar pelo método de extração utilizado e condições de cultivo da planta. Dentre os principais compostos bioativos encontrados nos extratos e óleos dessa espécie, estão os ácidos rosmarínico e fenólicos, flavonoides, cineol, pineno e borneol, todos responsáveis por seus efeitos farmacológicos, como redução da resposta inflamatória, proteção do estresse oxidativo, atividade antimicrobiana, dentre outros (Andrade, J.M. *et al.*, 2018; Oliveira, J.R. *et al.*, 2017).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma nova formulação de filme polimérico à base de quitosana com incorporação de ORA para o manejo de lesões causadas por queimaduras, com foco na sua caracterização físico-química e atividade antimicrobiana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUEIMADURAS

As queimaduras são traumas subestimados (Jeschke, M.G. *et al.*, 2020) e definidas, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2023), como lesões na pele ou outro tecido orgânico, causadas pelo calor, contato direto com fogo, eletricidade, radiação, fricção, gases ou substâncias químicas. Os fatores de risco são multivariados e elas representam um dos principais problemas de saúde pública por afetar não somente a estética e o psicológico do indivíduo, mas também pode levar à morte (Parvizi, A. *et al.*, 2023). Lesões por queimaduras não fatais representam uma das principais causas de morbidade, como sequelas e perda de funções motoras, podendo acarretar em longo tempo de hospitalização, desfiguração e incapacidade. Além disso, as cicatrizes hipertróficas resultantes de algumas lesões podem levar a modificações de comportamento e humor, como depressão e apatia, podendo gerar doenças psicopatológicas (Guimarães, M.A. *et al.*, 2012), o que impacta a qualidade de vida.

Dados da OMS (2023) revelam que as feridas por queimaduras constituem o quarto problema mais comum causado por esse tipo de trauma no mundo, com número de mortes que chegam a 180.000 pessoas por ano, ocorrendo principalmente em países de baixo e médio desenvolvimento, se correlacionando com *status* socioeconômico. Essa correlação se dá por variados fatores, como campanhas preventivas ineficazes, profissionais do atendimento inicial sem treinamento qualificado e falta de acesso amplo à população (Potokar, T. *et al.*, 2020).

No Brasil, de acordo com a Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ, 2023), considerando-se a população em unidades hospitalares do SUS, as queimaduras decorrentes de acidentes foram mais frequentes em indivíduos de 20 a 39 anos (40,7%) e do sexo masculino (57%). Do total de acidentes ocorridos em domicílio, a maioria se concentra em jovens menores de 15 anos (92%), em idosos

(84,4%) e em mulheres (81,6%), que ocorreram principalmente com o manuseio de substâncias quentes. Já em relação aos óbitos por queimaduras no país, dados de 2015 a 2020 (Tabela 1) mostram um total de 19.772 mortes, sendo 53,3% decorrentes de queimaduras térmicas, 46,1% de queimaduras elétricas e 0,6% de outras causas, como radiação, substâncias químicas e geladura (Brasil, 2022), com destaque para o aumento de mortes em 2020, ano em que a pandemia de covid-19 começou no país e a quarentena foi adotada.

Tabela 1 – Número de óbitos por queimaduras e taxas de mortalidade, segundo causa específica de 2015 a 2020.

Ano	Todas as causas		Causas térmicas		Causas elétricas		Outras causas	
	N	TM	N	TM	N	TM	N	TM
2015	3.207	1,48	1.673	0,74	1.517	0,73	17	0,01
2016	3.297	1,47	1.813	0,76	1.462	0,70	22	0,01
2017	3.338	1,48	1.799	0,75	1.525	0,72	14	0,01
2018	3.230	1,40	1.756	0,71	1.455	0,69	19	0,01
2019	3.246	1,42	1.683	0,69	1.543	0,71	20	0,01
2020	3.454	1,48	1.821	0,73	1.615	0,74	18	0,01
Total	19.772		10.545		9.117		110	

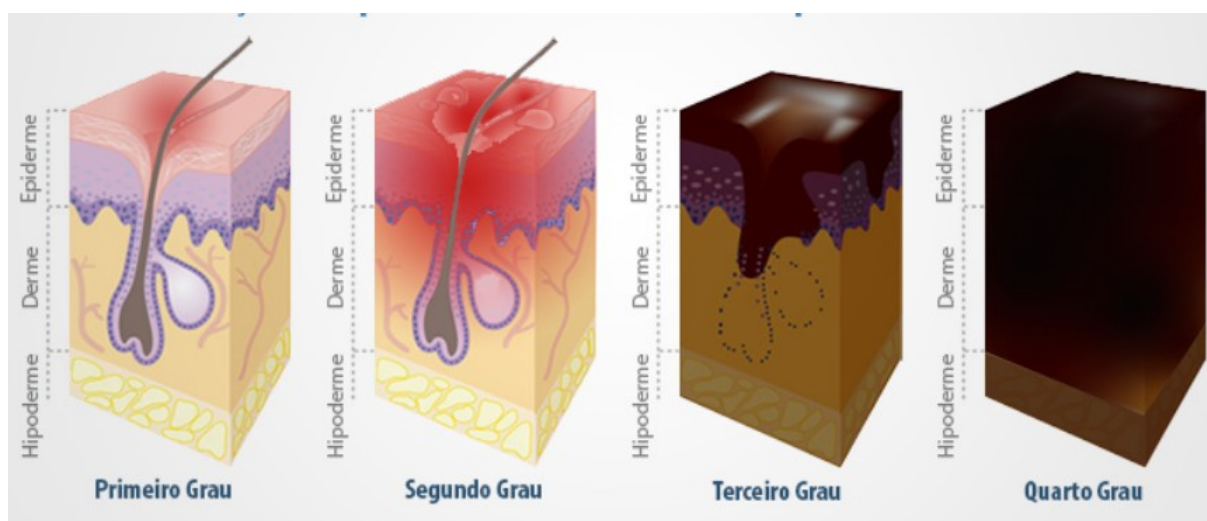
Fonte: Boletim Epidemiológico – Ministério da Saúde (2023).

Queimaduras podem variar em sua gravidade, o que depende da profundidade da lesão e da extensão da área que foi afetada. Sendo assim, as lesões podem ser classificadas, de acordo com Jeschke, M.G. *et al.*, 2020 e Greenhalgh, D.G., 2019, em lesões de diferentes graus (Figura 1):

- Lesões de primeiro grau: afetam a camada mais superficial da pele (epiderme) e apresentam aparência seca e vermelha com dor de duração limitada.
- Lesões de segundo grau: são consideradas de espessura parcial, penetram na derme, mas não a ultrapassa. São dolorosas devido a perda da barreira epidérmica, formam bolhas e tem secreção de fluido intersticial. Elas requerem curativos e cuidados especiais com a ferida e pode levar ao surgimento de cicatrizes. No entanto, não há necessidade de cirurgia.

- Lesões de terceiro grau: são consideradas de espessura total e ocorre destruição de toda a derme, penetrando na gordura. Em geral, elas não são dolorosas ou são menos dolorosas que as de segundo grau pois os receptores de dor são parcialmente destruídos.
- Lesões de quarto grau: abrangem músculos, ossos ou tendões, ficando muitas vezes mais escuras e frequentemente levando a perda da área queimada.

Figura 1: Graus de lesões em queimaduras.



Fonte: MultiSaúde Educacional. Queimaduras (2018).

O manejo das queimaduras é considerado complexo e multifacetado (McLure, M. *et al.*, 2021), devendo levar em conta vários fatores como causa da lesão, extensão das lesões e a penetração tecidual (Markiewicz-Gospodarek, A. *et al.*, 2022). Para as lesões de primeiro grau, analgesia e hidratante já são suficientes para o tratamento e a cura é rápida. Já para as lesões de segundo grau, alguns cuidados devem ser tomados, sendo que quanto mais profundas, maior o tempo necessário para a cicatrização. Um tratamento adequado deve estimular a reepitelização. As feridas de terceiro grau que requerem mais de 2 a 3 semanas de cura, geralmente levam a cicatrizes hipertróficas, com frequente necessidade de excisão da área afetada e inserção de enxertos de pele, enquanto as queimaduras de quarto grau precisam ser tratadas em centros de queimaduras, podendo levar até a amputações (Greenhalgh, D.G., 2019). Dependendo do grau, a queimadura pode

gerar complicações, como hipotermia, cicatrizes, problemas ósseos e articulares e infecção (Kargozar, S. *et al.*, 2019).

O tratamento de queimaduras se constitui como um desafio, à medida que o ambiente úmido da ferida propicia a adesão e multiplicação de microrganismos, levando a ocorrência de infecções secundárias (Torres M.J.M., Peterson J.M., Wolf S.E., 2021). Além do local ser propício para o desenvolvimento de alguns microrganismos, a própria resposta imune adaptativa do paciente fica comprometida, visto que ocorre uma grande liberação de citocinas e quimiocinas, ocasionando a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica e supressão da proliferação de células T e produção de IL-2, o que pode resultar em uma susceptibilidade maior às infecções. Quanto maior e mais grave a queimadura, maior o risco de complicação infecciosa (Jeschke, M.G., *et al.*, 2020), além de outros fatores de risco, como pacientes diabéticos (Ladhani, H.A; Yowler, C.J; Claridge, J.A., 2021).

2.2 INFECÇÕES SECUNDÁRIAS EM QUEIMADURAS

Uma infecção secundária afeta os aspectos gerais do paciente, prolonga o tempo de internação e recuperação, ao mesmo tempo que aumenta os custos do tratamento (Aziz, Z.; Abdul, R.H.B., 2017). A ocorrência de infecções é uma das complicações mais frequentes após queimaduras graves com propensão de evolução para sepse, choque séptico e Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO) (Torres M.J.M., Peterson J.M., Wolf S.E., 2021) e sua gravidade é diretamente relacionada com o tamanho da ferida (Palmieri, T.L., 2019). Segundo estudos de Gomez, R. *et al.* (2009) com base nos resultados de autópsias em uma unidade de queimados, 61% dos pacientes foram à óbito devido a infecções, com a maioria dos quadros apresentando pelo menos uma falência de órgãos associada.

Apesar das melhorias ao longo dos anos, infecção e sepse ainda são as principais causas de morte após queimaduras, principalmente quando se leva em conta a colonização por microrganismos multirresistentes (Vinaik, R. *et al.*, 2019), não somente devido ao tratamento com antimicrobianos, como também vindos da própria microbiota residente do paciente das áreas adjacentes não afetadas (Jeschke, M.G. *et al.*, 2020).

As feridas por queimaduras são colonizadas predominantemente e inicialmente (até o 5º dia) por bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*,

principalmente em queimaduras faciais, e algumas espécies de *Streptococcus* (Church, D. *et al.*, 2006), sendo gradualmente substituídas ao longo do processo (depois do 5º dia) por bactérias Gram-negativas (Azzopardi, E.A. *et al.*, 2011), como *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *K. pneumoniae* e *A. baumannii*, as quais são associadas ao aumento do risco da infecção (Ladhani, H.A.; Yowler, C.J; Claridge, J.A., 2021). A transição dessa colonização, especialmente as colonizadas por *P. aeruginosa*, normalmente é marcada por mudança de cor para amarelo-esverdeado e odor frutado (Cambiaso-Daniel J, *et al.*, 2018). Em relação às espécies fúngicas, *Candida albicans* é o agente fúngico mais comum (Zhou, J. *et al.*, 2019).

Além do espectro microbiano variado, o diagnóstico da infecção é complicado, já que muitos sintomas clínicos, como dor, febre e taquicardia também são causados pelo sistema imune em resposta à própria lesão. Por isso, outros aspectos devem ser considerados, como alteração de cor, profundidade da lesão, odor e presença de eritema (Ladhani, H.A; Yowler, C.J; Claridge, J.A., 2021). De acordo com Cambiaso-Daniel J., *et al.*, 2018, existem diferentes tipos de quadros clínicos associados às infecções que afetam uma queimadura, dentre elas:

- Celulite: uma infecção superficial de caráter não invasivo na queimadura e tecidos ao redor. É originada pela microbiota residente, comumente suscetível às linhas de tratamento.
- Impetigo: uma infecção mais frequente em pacientes com queimaduras faciais e portadores de *S. aureus*, comumente MRSA (do inglês *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina). A infecção começa por um exsudato no lábio superior e se espalha para o tecido queimado circundante.
- Infecção invasiva por queimadura: ocorre alteração de cor, intensa drenagem exsudativa e forte odor na ferida, podendo ou não resultar em sepse. Nesse caso, a ferida se expande também para os tecidos não queimados e antibioticoterapia é normalmente ineficaz. O ectima gangrenoso é considerada uma infecção invasiva e é causada por *P. aeruginosa*.
- Infecção fúngica: com o aumento de antibacterianos tópicos de amplo espectro houve um aumento na colonização por espécies fúngicas, incluindo espécies de *Candida* resistentes, podendo inibir também a reepitelização da ferida.

Já na sepse, são variados os fatores de risco associados, além da alta quantidade de bactérias na queimadura, cuidado tardio com a ferida e diminuição da massa corporal magra (Cambiaso-Daniel J., *et al.*, 2018). Além disso, a infecção por meio da lesão de queimadura não é a única fonte de sepse em pacientes com queimaduras graves, podendo estes contrair infecções nosocomiais comuns e associadas a cateteres (Ladhani, H.A; Yowler, C.J; Claridge, J.A., 2021).

2.3 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA INFECÇÕES SECUNDÁRIAS EM QUEIMADURAS

Os tratamentos que visam a prevenção e o controle da infecção são mais desafiadores nas vítimas de queimaduras do que em pacientes com outras doenças. Isto ocorre devido a uma escassa concentração de antimicrobianos no tecido queimado, que se combina com uma imunossupressão induzida. Tal fato leva a uma falha na terapia e a resistência aos medicamentos, sendo necessário o uso correto dos medicamentos tópicos (Patel, K. *et al.*, 2023).

Entre as substâncias medicamentosas comumente utilizadas, algumas merecem destaque pelo uso frequente nessas condições, como o nitrato de prata. Este é eficaz no combate de espécies bacterianas, porém pode levar à alteração dos eletrólitos séricos do corpo, além de possuir uma baixa penetração e ser relatado febre alta como reação adversa em alguns pacientes (Greenhalgh, D.G., 2019).

Já a sulfadiazina de prata, apesar de poder reduzir consideravelmente a dor nessas lesões, tem ação exclusivamente na camada epidérmica, não se estendendo para o tratamento de tecidos subjacentes (Robson, M.C., 1979). Além disso, este medicamento pode retardar o processo de regeneração da pele (Greenhalgh, D.G., 2019).

O acetato de mafenida, apesar de prevenir a colonização microbiana na área afetada, pode causar acidose respiratória, além de causar um desequilíbrio ácido-base se aplicado em grandes lesões (Patel, K. *et al.*, 2023). Outra opção muito utilizada é o antisséptico iodopolividona, porém ela apresenta inúmeras desvantagens como aumento da dor, toxicidade elevada, formação excessiva de ácido e pode levar até a insuficiência renal (Moncrief, J.A., 1985).

Medicamentos tópicos contendo antimicrobianos clássicos também são utilizados. Agentes tópicos com sulfato de gentamicina, embora utilizados, apresentam um problema relacionado, como a resistência adquirida por parte de algumas espécies bacterianas devido ao uso excessivo (Gallagher, J.J. *et al.*, 2012). Algumas pomadas com sulfato de neomicina e bacitracina e pomadas com polimixina são aplicadas em lesões pequenas, porém devem ser interrompidas depois de 1 semana, uma vez que tendem a provocar irritação na pele (Greenhalgh, D.G., 2019), além de não serem suficientemente eficazes no controle da infecção (Patel, K. *et al.*, 2023). Já a nitrofurantoína tem eficácia contra bactérias Gram-negativas, mas não contra *P. aeruginosa* (Gallagher, J.J. *et al.*, 2012), microrganismo importante nas infecções secundárias nas queimaduras.

Antimicrobianos comumente aplicados na terapia sistêmica, além de não serem eficazes contra patógenos resistentes, têm dificuldade de se manter em concentrações estáveis e de alcançar os tecidos devido à baixa vascularização no local (Tejiram, S.; Shupp, J.W., 2020). Por isso, o desenvolvimento de formulações inovadoras para tratar queimaduras é necessário, buscando terapias mais seguras e com maior eficácia para promover uma melhor cicatrização e controlar e prevenir infecções.

2.4 FILMES POLIMÉRICOS

Curativos para feridas podem ser benéficos no caso das queimaduras. Além de agirem como dessecante, evitam contaminação e injúrias maiores à pele e estimulam o processo de cicatrização (Patel, K. *et al.*, 2023). Atualmente, já existem alguns tipos de curativos no mercado, como curativos de alginato (Aquacel®), antimicrobianos (Acticoat®), à base de colágeno (Fibracol®), hidrocoloides (Duoderm®), à base de hidrogel (Dermagel®) e à base de espuma de poliuretano (SilvaSorb®). A escolha do curativo ideal vai depender da profundidade da lesão, local, quantidade de drenagem, quantas trocas serão necessárias e o custo.

Filmes poliméricos constituem uma matriz que pode ser composta por um ou mais polímeros, que vão apresentar propriedades funcionais e físico-químicas específicas (Borges, A.F., *et al.*, 2015). Quando elaborados pela técnica de evaporação do solvente, são feitos à base de polímeros pela formação de uma solução precursora que, quando aplicadas sobre uma superfície (por exemplo, as

placas de *petri* ou laminador) e levadas para secagem, formam películas, que apresentam adesividade e elasticidade, além de oferecerem vantagens extras em relação a outras formas de administração, como facilidade de aplicação, manutenção da umidade do ambiente e barreira para microrganismos (Silva, A.C., 2022).

Os filmes poliméricos podem ser abordagens promissoras para o cuidado dos pacientes acometidos por essas condições. Um bom filme para o tratamento de queimaduras deve possuir algumas características das descritas a seguir (Agarwal, A. *et al*, 2011):

- Biocompatibilidade;
- Atoxicidade;
- Controla umidade na ferida;
- Remove o excesso de exsudato;
- Evita a dessecação;
- Adere corretamente à área afetada;
- Promove desbridamento autolítico;
- Forma uma barreira semipermeável, permitindo trocas gasosas;
- Impermeabilidade a microrganismos;
- Oferece proteção mecânica;
- É confortável e de fácil aceitação estética;
- Flexível e adaptável conforme os movimentos;
- Fácil aplicação e remoção.

Além dessas características, é imperativa a necessidade de propriedades antimicrobianas em um filme funcional, prevenindo as infecções secundárias nas queimaduras.

Filmes bioativos podem ser formulados à base de vários polímeros e produzidos por diferentes métodos, como impressão 3D, fiação por solução e por evaporação do solvente. Estes últimos, desenvolvidos neste estudo, são minimamente constituídos de polímero, plastificante e solvente e misturados em temperaturas mais baixas (Santos, C.C., 2018). A escolha do polímero a ser utilizado depende do objetivo de aplicação e das características que se deseja que o filme possua. Os polímeros sintéticos são criados artificialmente, enquanto os semissintéticos são criados pela modificação de polímeros naturais.

Entre os polímeros mais comuns dessas classes, estão o ácido poliacrílico, ou poliacrilato, que apesar de ser utilizado como sistema de entrega de ativos, absorvem muita água, gerando turgidez, podendo gerar desconforto ao paciente (Gomes, T.V., *et al*, 2023). Outro polímero sintético utilizado em formulações tópicas é o álcool polivinílico (PVA), cujas propriedades de mucoadesão são altamente variáveis entre indivíduos e variam também dependendo do local de aplicação (Muller, L. *et al*, 2023). Já a carboximetilcelulose (CMC), um polímero semissintético, modificado a partir da celulose, tem recebido interesse notável como adjuvante também na entrega de fármacos. Além da biocompatibilidade e baixa toxicidade, a grande quantidade de grupos hidroxila em sua estrutura química, permite o controle de sua carga e liberação (Sunasee, R.; Hemraz, U.D.; Ckless, K., 2016).

Os polímeros naturais exibem algumas vantagens em relação aos polímeros sintéticos. Entre elas, destaca-se a mimetização de vias naturais em regeneração de tecidos, alta biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (Yasayan, G. *et al*, 2022). A estrutura molecular desses polímeros possui grupamentos funcionais que interagem fisicamente ou quimicamente com componentes na mucosa, gerando mucoadesividade favorável através da interpenetração das cadeias (He, M. *et al*, 2021) e aumentando a absorção de ativos (Gomes, T.V., *et al*, 2023).

Em meio a ampla gama de polímeros naturais estudados na produção de filmes, destacam-se alguns principais (Gomes, T.V., *et al*, 2023), como o alginato e derivados, que são encontrados em algas marrons, e se constituem como um polímero aniônico, apresentando não imunogenicidade e propriedades de geleificação. No entanto, não é considerado um polímero naturalmente adesivo, tendo que ser submetido a um processo de oxidação para conseguirem, de fato, interagir com proteínas da matriz extracelular (Bunney, P., *et al*., 2017).

A pectina é um polímero natural abundante, extraída majoritariamente de cascas de frutas, é aniônico e resistente contra a degradação de algumas enzimas, como proteases e amilases. Muito utilizada por suas propriedades estabilizantes e geleificantes, sendo relatada por autores como eficaz no processo de cicatrização de feridas (Chandel, V. *et al*., 2022). Já a goma xantana é um polímero polissacarídeo aniônico, derivado da fermentação do gênero de bactérias *Xanthomonas*. É considerado como um dos principais polissacarídeos microbianos e é muito utilizado na indústria como agente espessante e estabilizante, além de ter importância na liberação controlada de ativos. No entanto, possui algumas características

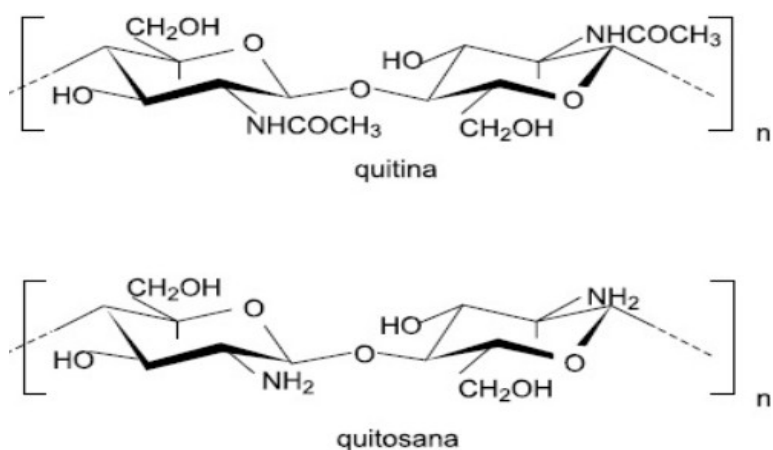
indesejáveis, como grau imprevisível de retenção de água, qualidades mecânicas limitadas, viscosidade instável e baixa resistência ao cisalhamento (Jadav, M. *et al.*, 2023).

Outro polímero que vêm ganhando cada vez mais destaque e é objeto de estudo em muitas áreas é a quitosana, que além de exibir propriedades estruturais interessantes, como biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade, também exibe atividades biológicas (Gomes, T.V., *et al.*, 2023), as quais podem ser importantes no tratamento das lesões causadas por queimaduras e infecções secundárias associadas.

2.5 QUITOSANA

A quitosana é um polímero polissacarídeo natural, cuja diferença dos polímeros apresentados anteriormente é a sua característica catiônica. É constituído por resíduos de glucosamina conectados por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4)-glicosídicas, que se encontra principalmente na composição das paredes fúngicas e em artrópodes, assim como em esponjas, corais e nos moluscos. Como todo polímero, apresenta características como baixa densidade, resistência a corrosão e não conduz corrente elétrica, na maioria dos casos. Ela é obtida por meio de hidrólise dos grupos acetilamina (-NHCOCH₃) (Figura 2), ou seja, por meio da desacetilação parcial da quitina. Suas propriedades físico-químicas dependem da origem da quitina e das condições de desacetilação, que vão levar a diferentes graus de desacetilação e peso molecular (Latanska, I. *et al.*, 2020).

Figura 2: estrutura química da quitina e seu derivado, quitosana.



Fonte: Base de dados Scielo Brasil (2023).

Esse polímero é biodegradável, atóxico, biocompatível e possui boa adesão às células. Uma quitosana com alto grau de desacetilação e baixo peso molecular tem a capacidade de ativar macrófagos e granulócitos, estimulando a migração e proliferação de células endoteliais e fibroblastos, além de induzir a produção de citocinas, e aumentar a produção de colágeno tipo IV (Paul, P.; Kolesiyska, B.; Sujka, W. *et al.*, 2019), o que são ótimas propriedades no tratamento das queimaduras. Suas cargas positivas são capazes de interagir com cargas negativas dos eritrócitos e trombócitos e ativar vias de coagulação extrínsecas, o que ajuda a impedir o sangramento. Além das características mencionadas, a quitosana tem a capacidade de promover a angiogênese e possui propriedades hemostáticas (Cai-Ling, K. *et al.*, 2021). Estudos mostraram que a quitosana possui efeitos positivos na granulação e reepitelização da pele, reduzindo a formação das cicatrizes (Catanzano, O.; Boateng, J., 2015; Alemdaroglu, C. *et al.*, 2006).

A quitosana também é conhecida e utilizada pela sua atividade antimicrobiana, que se deve à alteração da permeabilidade celular microbiana (Rabea, E.I. *et al.*, 2003) e principalmente às interações das moléculas carregadas positivamente da quitosana com as membranas microbianas carregadas negativamente, causando rompimento da membrana levando ao vazamento dos componentes celulares microbianos (Raafat, D. *et al.*, 2008). Outro modo de ação da quitosana é a ligação com o DNA microbiano, culminando na inibição do RNAm e da produção de proteínas (Hadwiger, L.A. *et al.*, 1986). Estudos confirmaram atividade antibacteriana bactericida e bacteriostática da quitosana tanto para bactérias Gram-positivas, como *S. aureus* (Zhilong, Q. *et al.*, 2021), quanto para bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Atividade antifúngica fungicida e fungistática também foi relatada para espécies do gênero *Aspergillus* e *C. albicans* (Ranjbar, R.; Yousefi, A., 2018). A atividade antimicrobiana da quitosana pode ser influenciada por fatores, como pH e peso molecular. Sua solubilidade aumenta conforme o pH da solução diminui, levando ao aumento de suas cargas positivas. Já seu peso molecular influencia à medida que moléculas com grande tamanho e peso possuem dificuldade para atravessar a parede celular dos microrganismos (Cai-Ling, K. *et al.*, 2021).

A quitosana, além das suas próprias atividades biológicas, pode ser utilizada de várias formas e vem sendo utilizada em matrizes para transportar ativos farmacológicos (Markiewicz-Gospodarek, A. *et al.*, 2022), devido à sua capacidade de complexar ativos em sua estrutura, e é uma boa candidata para entrega de drogas pela via transdérmica (Paul, W.; Sharma, C.P., 2000), com um bom potencial filmogênico (Patrúlea, V. *et al.*, 2015).

As propriedades acima mencionadas da quitosana fazem com que ela seja um polímero versátil, aplicada em várias formulações, e se combinada com mais substâncias de potencial farmacológico, um sinergismo pode acontecer e suas atividades biológicas serem aprimoradas (Labib, R.M., *et al.*, 2019).

2.6 ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.)

Desde milhares de anos, a população humana utiliza recursos vegetais da natureza para tratar problemas de saúde. O uso de extratos, óleos vegetais e resinas costuma ser utilizado no tratamento de primeiros socorros de feridas e queimaduras porque muitas espécies vegetais apresentam atividade anti-inflamatória, antioxidante, cicatrizante (Woollard, A.C.; Tatham K.C.; Barker, S., 2007) e antimicrobiana (Genena, A.K. *et al.*, 2008), promovendo a regeneração da pele afetada e reduzindo e controlando o risco de infecções.

Entre as plantas que apresentam propriedades biológicas interessantes para o tratamento das queimaduras, está o alecrim, conhecido como a Erva do Ano pela Associação Internacional de Ervas em 2000. É uma planta aromática que se apresenta em forma de um arbusto lenhoso perene. Possui folhas regulares, pequenas e de cor verde escuro acima na folha e tons acinzentados abaixo, com flores variando do azul ao violeta (Figura 3). O alecrim veio originalmente da região do Mediterrâneo, mas atualmente é cultivado largamente e distribuído pelo mundo, sendo sua produção considerada de baixo custo (Begum, A. *et al.*, 2013).

Figura 3: alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)



Fonte: unebrasil.org (2019).

A composição química dessa planta é variável e complexa, podendo variar devido às variedades da planta e as condições de cultivo. Ela é constituída por muitos compostos bioativos, que as conferem propriedades medicinais e aromáticas. Estudos de Pintore, G. *et al.*, (2002) identificaram 58 compostos, considerando apenas uma amostra de óleo essencial caracterizado por cromatografia gasosa.

Entre os principais grupos de substâncias encontrados no alecrim, estão o ácido rosmarínico, que se relaciona à proteção do estresse oxidativo das células e à redução da resposta inflamatória, o cineol e o pineno, que ajudam nas respostas anti-inflamatórias, assim como os ácidos fenólicos, também presentes no alecrim (Jiang, Y. *et al.*, 2011). Além das substâncias mencionadas, também se encontram flavonoides, que apresentam propriedades antioxidantes, borneol com propriedades analgésicas e antissépticas e o camfeno, que confere seu aroma característico (Genena, A.K. *et al.*, 2008). Apesar do conhecimento de que suas atividades biológicas se dão por meio de sua composição, muitas são as moléculas envolvidas nesses processos, e definir qual molécula está associada a um efeito específico é complexo e raras são as identificações, já que o que ocorre é um intenso sinergismo entre seus metabólitos (Hyun, H.B., *et al.*, 2015).

Os usos do alecrim na medicina se estendem à várias finalidades, seja devido à sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, antinociceptiva, antidepressiva, antiulcerogênica, antitrombogênica ou antioxidante (Begum, A., *et al.*, 2013; Ribeiro-Santos, R. *et al.*, 2015; Ojeda-Sana, A.M., *et al.*, 2013). Em relação a sua atividade antimicrobiana, muitos estudos contribuíram para um maior

entendimento das propriedades antibacterianas do alecrim, como para *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (Jiang, Y. *et al.*, 2011), *E. coli*, *P. aeruginosa* e para espécies fúngicas, como *C. albicans* e *Aspergillus niger* (Andrade, J.M. *et al.*, 2018), utilizando extratos da planta, óleos essenciais ou óleo-resinas.

Óleos essenciais se caracterizam por serem compostos voláteis extraídos através de técnicas específicas, como destilação a vapor (Turek, C.; Stintzing, F.C., 2012), enquanto as óleo-resinas se constituem como uma combinação de resina e óleo essencial. A óleo-resina de alecrim (ORA) tem como característica uma cor verde acastanhada e se torna fluida quando aquecida a 50 °C (Heath, H.B., 1981) e pode ser obtida através de técnicas como extração mecânica da planta, ou no caso do alecrim, obtida utilizando remoção por solvente (Nivetha, G. *et al.*, 2019).

Curiosamente, muitos estudos direcionam seus esforços para o uso de óleo essencial do alecrim (OEA) no tratamento de feridas cutâneas (Macedo, L.M. *et al.*, 2020), mas poucos estudos utilizam a óleo-resina (Amorim, H.C.; Vianna L.V.; Nogueira, V.B., 2022), sendo que até o presente momento a busca por trabalhos que utilizassem a óleo-resina de alecrim incorporada em filmes poliméricos à base de quitosana para o tratamento de infecções secundárias nas queimaduras não retornou resultados.

Portanto, o objetivo deste trabalho visa o desenvolvimento de uma nova formulação de filme polimérico à base de quitosana com incorporação de ORA, a fim de potencializar os efeitos biológicos dos filmes, como o aumento de sua atividade antimicrobiana. A liberação sustentada dos compostos ativos do filme tem a finalidade de tornar o ambiente desfavorável para a multiplicação microbiana, podendo ajudar no controle de infecções associadas a queimaduras.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um filme polimérico à base de quitosana com incorporação de ORA e caracterizá-lo quanto às suas propriedades físico-químicas e sua atividade antimicrobiana, principalmente em relação a bactérias relacionadas a infecções secundárias nas queimaduras.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar a atividade antimicrobiana da ORA e quitosana por meio de *screening*.
2. Acompanhar a cinética de morte de *S. aureus* frente à ORA.
3. Desenvolver formulação de filme polimérico com quitosana e ORA, visando sua atividade antimicrobiana em microrganismos relacionados a queimaduras.
4. Avaliar o efeito da ORA no processo de agregação da quitosana por medidas de Potencial Zeta (PZ) e fotometria por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).
5. Avaliar o efeito da temperatura de secagem dos filmes em relação a sua estabilidade.
6. Avaliar as propriedades físicas do filme com base nos parâmetros de peso médio, espessura, umidade, grau de intumescimento e solubilidade.
7. Analisar as interações moleculares dos constituintes da formulação por espectroscopia na região do infravermelho e RAMAN.
8. Confirmar a atividade antimicrobiana da formulação frente a microrganismos relacionados às infecções em queimaduras.

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DA ORA

Para realização do trabalho, o projeto foi devidamente cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com o número de cadastro A05528A. A ORA utilizada nesse trabalho foi obtida comercialmente junto à Engenharia das Essências Comercial LTDA. Segundo o laudo técnico (Anexo 1) disponibilizado pela empresa, a ORA foi extraída por solvente das partes aéreas secas da erva.

4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CONSTITUINTES DO FILME

4.2.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Microbicida Mínima (CMM) da ORA e da quitosana

A investigação da atividade antimicrobiana da ORA e da quitosana, por meio da CIM, foi determinada por técnicas de microdiluição em caldo, segundo os padrões do M100 (CLSI, 2022). Um *screening* foi realizado para 17 espécies bacterianas (*Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27351, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus uberis* ATCC 9927, *Streptococcus oralis* ATCC 10557, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* FDC Y4; 4 estirpes de *S. aureus*, sendo 3 de referência – 2 sensíveis [ATCC 25904 e 29213] e 1 MRSA] ATCC 33591 – e 1 isolado clínico (BAA277), *K. pneumoniae* resistente ATCC 2874, *K. pneumoniae* amostra hospitalar, *A. baumannii* ATCC 19606, *A. baumannii* amostra hospitalar e *P. aeruginosa* INCQS 2742). Em relação às espécies fúngicas, 3 estirpes foram testadas, sendo 2 de *C. albicans* [uma amostra hospitalar e outra ATCC 40175] e 1 de *Candida tropicalis* ATCC 750.

Para esse teste, foi utilizada uma concentração de ORA de 5 mg/mL e de quitosana a 3,20 mg/mL. A solução de ORA foi previamente diluída em

dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração 100 vezes superior a inicial na microplaca, de modo que na microplaca a concentração de DMSO fosse 1,0%. Já a quitosana, foi diluída previamente em solução ácida a 1,0% e depois em caldo MH até a concentração desejada. Um antimicrobiano clássico, azitromicina, foi utilizado como controle de atividade para espécies bacterianas a uma concentração de *breakpoint* a 8 µg/mL. Para as espécies fúngicas testadas, foi utilizado como controle de atividade cloranfenicol a uma concentração de 2,50 mg/mL.

Paralelamente, foi realizado um teste controle com o solvente, DMSO, na concentração utilizada no experimento. Dessa forma, 100 µL de substância teste e 20 µL de suspensões bacterianas de 10⁶ UFC/mL e fúngicas de 10⁸ UFC/mL (de acordo com a escala de 0,5 McFarland) foram adicionados nos poços de uma microplaca, ajustando o volume final com caldo MH até 200 µL. As placas foram então incubadas em estufa por 24 horas (h) a 35 ± 2°C em atmosfera própria para cada espécie de microrganismo e o resultado foi avaliado de acordo com a turvação de cada poço. Os poços que apresentavam turvação indicaram que os compostos não apresentaram atividade antimicrobiana naquela determinada concentração, ao contrário dos poços sem turvação, que indicaram atividade para a determinada concentração. Os resultados foram confirmados em espectrofotômetro, realizados em duplicata e em três replicatas biológicas.

Para investigar se a atividade da ORA e quitosana seria microbicida ou microbiostática para as espécies microbianas utilizadas, alíquotas de 10 µL foram retiradas dos poços que não apresentaram crescimento microbiano e estriadas em uma placa com meio nutritivo. As placas foram então incubadas em estufa por 24 horas a 35 ± 2°C e o resultado lido de acordo com a formação de colônias. Nas placas onde não houve formação de colônias, significou uma atividade microbicida do composto, enquanto onde não se observou, uma atividade microbiostática foi registrada (Spencer & Spencer, 2004).

4.2.2 Cinética de morte

A fim de acompanhar o crescimento microbiano de uma estirpe de *S. aureus* sensível ATCC 25904 e uma *S. aureus* MRSA ATCC 33591 na presença da ORA, o ensaio de cinética de morte foi realizado por meio de técnicas de microdiluição segundo as normas do M100 (CLSI, 2022). Inicialmente, os inóculos bacterianos

foram ajustados para a escala de 0,5 McFarland. A solução de ORA utilizada foi preparada de acordo com o resultado da CIM para as estirpes bacterianas em questão, de forma que se atingisse concentrações de 2 CIM, CIM, 0,5 CIM e 0,25 CIM. Como controle de atividade, azitromicina foi utilizada na concentração de CIM de 6,25 µg/mL para *S. aureus* sensível e 400 µg/mL para a *S. aureus* MRSA. Foram preparadas também soluções de “branco”, nas quais não continham inóculo, apenas salina e ORA nas concentrações determinadas. As microplacas foram então incubadas a 35 ± 2 °C por 72 h e as leituras foram realizadas em triplicatas para determinação da densidade ótica em um espectrofotômetro nos tempos de 0 h, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h e 72 h. Para gerar os valores da curva, descontaram-se os valores dos “brancos”. Os resultados foram expressos com o valor médio $\pm$ desvio padrão.

4.3 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO DE FILMES À BASE DE QUITOSANA COM INCORPORAÇÃO DE ORA

Para o filme polimérico à base de quitosana com ORA, 5 formulações foram testadas a partir de modificações dos estudos de Aksungur, P. *et al.* (2004) e Cázon, P. *et al.* (2021) pelo método de evaporação do solvente. As formulações iniciais F1 e F2 com 1,0% de ORA foram laminadas com auxílio de um laminador, sendo que a F2 foi também vertida em placa de *petri* (em um volume de 3 mL), e secadas gradualmente e à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). A F3 foi apenas vertida (em um volume de 17 mL) em placas de *petri* de poliestireno tratadas e produzidos filmes branco (sem adição de ORA) e com ORA nas concentrações de 1,0%, 2,5% e 5,0%, enquanto a F4 e a F5 foram vertidas (em um volume de 12 mL) em placas de *petri* de vidro sendo produzidos filmes branco e com ORA nas concentrações de 0,2%, 0,5% e 1,0% (Tabela 2).

Tabela 2: Concentrações de ORA presente nas diferentes formulações.

Concentrações ORA (%)			
F1	1,0	-	-
F2	1,0	-	-
F3	1,0	2,5	5,0

F4	0,2	0,5	1,0
F5	0,2	0,5	1,0

Fonte: elaborada pela própria autora (2023).

Para o desenvolvimento dos filmes, foram realizadas as etapas de acordo com o fluxograma ilustrado na figura 4. A quitosana utilizada no estudo foi a de baixo peso molecular e grau de desacetilação entre 75% e 85% (Sigma Aldrich) e o ácido para protonação da quitosana utilizado foi o ácido DL-málico (Synth). Para emulsificação da ORA, *Tween* 80 foi utilizado. Mais detalhes sobre a formulação foram omitidos por motivos de produção de patente.

Figura 4: fluxograma do processo de formulação dos filmes.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

4.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA (PZ) E DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO (DHm) DAS PARTÍCULAS DAS SOLUÇÕES PRECURSORAS DOS FILMES

O PZ e o DHm foram avaliados pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) com um ângulo de incidência do laser em relação à amostra de 173°. O PZ foi determinado por meio de avaliação da mobilidade eletroforética. Em relação às diluições das amostras para ambos os testes, uma amostra de 100 µL de cada solução precursora dos filmes da F4 foi previamente diluída em 1,9 mL de água deionizada e, em seguida, adicionada a uma cubeta de polietileno. Os valores

resultantes do PZ e do DHm foram determinados como a média de três medidas independentes e à temperatura ambiente, utilizando o equipamento Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido)

4.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DOS FILMES FORMULADOS

4.5.1 Avaliação da estabilidade dos filmes às diferentes temperaturas de secagem

Esse teste foi conduzido considerando diferentes condições de secagem para as formulações F2, F3, F4 e F5. A formulação F2 foi submetida ao processo de secagem à temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), enquanto a F3 foi submetida a um período inicial de quatro dias a uma temperatura de $18 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido por 3 dias à temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), e depois submetido à secagem em estufa a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 h. Já a F4 permaneceu cinco dias em estufa a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, finalmente, a F5 foi diretamente colocada em estufa a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 h.

4.5.2 Determinação do peso médio

O peso médio de cada filme das formulações F3, F4 e F5 foi determinado pela pesagem em balança analítica de 10 recortes de cada filme em proporções de 1,0 cm x 1,0 cm. Os valores foram registrados e os resultados expressos em relação à média $\pm$ desvio padrão (SHAH, A. *et al.*, 2019).

4.5.3 Determinação da espessura

A medida da espessura de cada filme das formulações F3, F4 e F5 foram determinadas com o auxílio de um paquímetro digital para os 10 recortes selecionados anteriormente. Os valores foram registrados e os resultados expressos em relação à média $\pm$ desvio padrão (DEVI, N; DUTTA, J. *et al.*, 2017).

4.5.4 Determinação do teor de umidade

A fim de determinar a umidade de cada filme, 4 recortes das formulações F3, F4 e F5 de pontos distintos em proporções de 1,0 cm x 1,0 cm foram feitos. Em

seguida, eles foram pesados em balança analítica e os valores devidamente registrados. Esses recortes foram então levados para uma estufa de secagem a $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Os filmes foram, em seguida, pesados novamente e a diferença registrada (Shah, A. *et al.*, 2019). O cálculo do teor de umidade, expressa em porcentagem, foi feita de acordo com a fórmula, considerando como P_i o peso inicial dos filmes e P_f o peso final e os resultados expressos em relação à média $\pm$ desvio padrão:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(P_i - P_f) \times 100}{P_i}$$

4.5.5 Determinação do grau de intumescimento

A fim de determinar o grau de intumescimento dos filmes, 3 recortes das formulações F3, F4 e F5 de proporções de 1,0 cm x 1,0 cm foram pesados em balança analítica e utilizados em seguida. Os recortes foram imersos em fluido simulador de feridas, cuja constituição foi de 0,68 g de NaCl, 0,22 g de KCl, 2,5 g de NaHCO_3 e 0,35 g de NaH_2PO_4 diluídos em 100 mL de água destilada com pH a 7,4, por 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nos tempos de 1 h, 4 h, 8 h e 24 h os recortes foram retirados com auxílio de pinça e o excesso de água foi retirado pelo uso de papel filtro, sendo pesados novamente (Pansara, C. *et al.*, 2020). Por fim, a capacidade de intumescimento foi determinada de acordo com a fórmula abaixo, considerando P_0 o peso inicial dos filmes e P_i o peso intumescido. Os resultados foram expressos em relação à média $\pm$ desvio padrão:

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{(P_i - P_0) \times 100}{P_0}$$

4.5.6 Determinação da solubilidade

A solubilidade dos filmes foi determinada com os 3 recortes das formulações utilizados no ensaio de intumescimento. Após o referido ensaio, os filmes foram colocados em estufa de secagem a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h e, em seguida, pesados em balança analítica com auxílio de pinça. A porcentagem de solubilidade foi calculada de acordo com a fórmula, considerando P_0 o peso inicial dos filmes e P_s o peso após secagem e os resultados expressos em relação à média $\pm$ desvio padrão:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{(P_0 - P_s) \times 100}{P_0}$$

4.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES POR ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA VIBRACIONAL RAMAN E (FT-IR)

A fim de analisar as interações moleculares presentes nos filmes formulados em relação aos seus constituintes puros, a metodologia de espectroscopia RAMAN foi empregada. As amostras dos filmes e de seus constituintes isolados (quitosana, ORA e *Tween* 80) foram analisadas em Espectrômetro FT-Raman Bruker-RFS-100, equipado com um detector de germânio refrigerado por nitrogênio líquido, acoplado a um microscópio Olympus com lente objetiva de magnificação de longo alcance de 40 vezes com linha de excitação do laser Nd-YAG com comprimento de onda de 1064 nm e potência de 400 mW, com 512 scans.

As amostras dos filmes também foram analisadas por FT-IR, a fim de complementar os resultados obtidos pela espectroscopia RAMAN, por meio de Espectrofotômetro Bruker Vertex 70, com modo de Reflectância Total Atenuada (ATR) de cristal de diamante, que dispensa o uso de pastilhas KBr e permite a análise de amostras sólidas, com janela espectral de 30 a 6000 cm^{-1} . Os espectros foram obtidos pela média de 16 varreduras consecutivas com resolução de 2 cm^{-1} . Os dados dos espectrogramas gerados pelas duas metodologias foram exportados e analisados pelo software OriginPro 2016.

4.7 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS FILMES

A confirmação da atividade antibacteriana dos filmes foi realizada pelo método de disco-difusão frente às espécies Gram-negativas *A. baumannii* ATCC 19606 e *P. aeruginosa* INCQS 2742 e a Gram-positiva *S. aureus* MRSA ATCC 33591. Suspensões bacterianas frescas desses microrganismos foram ajustadas à escala McFarland de 0,5 e, em seguida, com auxílio de *swab* estéril, foi semeado uniformemente em placa com meio Mueller-Hinton Ágar (MHA).

Para realização de esse ensaio, 9 discos (5 mm) foram dispostos equidistantes em cada placa, sendo um disco de papel impregnado com iodopolividona (controle positivo), um disco de papel impregnado com Tween 80 na mesma concentração utilizada para formulação dos filmes, 3 discos de papel impregnados com soluções de 0,2%, 0,5% e 1,0% de ORA + Tween 80 na mesma concentração e 4 discos dos filmes da F5, correspondentes ao filme branco, 0,2%, 0,5% e 1,0% ORA. As placas foram, em seguida, incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. O teste foi realizado em triplicata e a leitura foi realizada com auxílio de régua graduada em função do tamanho de halo de inibição formado. Os valores resultantes foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney ($p < 5$) pelo software Jamovi.

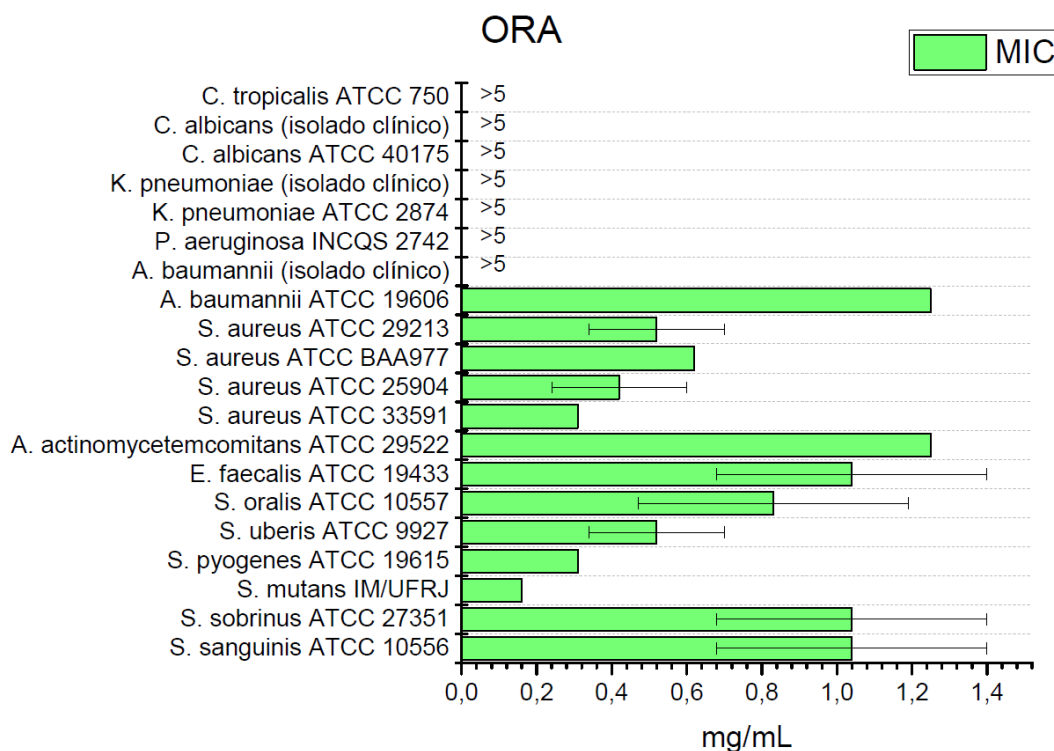
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CONSTITUINTES DOS FILMES

5.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Microbicida Mínima (CMM) da ORA

A determinação da CIM na pesquisa de substâncias antimicrobianas é essencial, visto que esses valores se relacionam com a eficácia do composto em questão. Ela permite mensurar a menor concentração de uma determinada substância capaz de inibir o crescimento microbiano de alguma espécie, sendo quanto menor o valor maior sua atividade e maior a susceptibilidade do microrganismo frente à substância (Kowalska-Krochmal, B.; Dudek-Wicher, R., 2021). Os resultados obtidos pelo teste de CIM podem ser visualizados na Figura 5.

Figura 5: valores de CIM da ORA frente aos microrganismos testados.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Com base nos resultados apresentados, a ORA mostrou atividade antimicrobiana para a maioria das estirpes testadas no *screening*, enfatizando aquelas envolvidas nas infecções secundárias em queimaduras. Essa atividade também foi relatada em outros estudos envolvendo extratos e óleos de alecrim. Luqman, S. *et al.* (2007) avaliou o potencial antimicrobiano do OEA frente às espécies Gram-positivas *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e às espécies Gram-negativas *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, relatando atividade antimicrobiana para todas as espécies, exceto *E. faecalis*. Os valores apresentados foram acima de 11 mg/mL e nenhum resultado foi relatado frente às bactérias Gram-negativas, exceto para *E. coli* resistente, no qual foi relatado atividade do OEA acima de 11 mg/mL em contraste com a estirpe sensível da mesma espécie, que não apresentou suscetibilidade. Esses resultados corroboram com os encontrados neste trabalho, em que a ORA apresentou atividade frente todas as bactérias Gram-positivas testadas, incluindo *E. faecalis*. No entanto, os valores de CIM da ORA encontrados para essas bactérias foram consistentemente menores dos que os relatados por Luqman, S. *et al.* (2007), variando os valores de CIM de 0,31 mg/mL a 1,04 mg/mL. Em relação às bactérias Gram-negativas, os resultados também se assemelham ao estudo citado, no qual nenhuma atividade antimicrobiana para a concentração

testada foi identificada, exceto para *A. baumannii*, cujo valor de CIM foi encontrado a 1,25 mg/mL.

Jiang, Y. *et al.* (2011) testou o OEA em comparação com dois de seus compostos puros, 1-8-cineol e α -pineno. Como resultado, o OEA foi mais eficaz para todas as espécies bacterianas testadas, sendo as Gram-positivas *S. epidermidis* e *S. aureus* e as Gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli*. No presente trabalho, não foi possível identificar atividade para *P. aeruginosa*, o que pode ser explicado pelos altos valores utilizados no trabalho referenciado anteriormente, cujos valores variaram até 10 mg/mL e o valor utilizado neste estudo atingiu uma concentração máxima de 5 mg/mL. Interessante notar que os autores acharam valores de CIM para o OEA em concentrações muito menores do que os dois compostos isolados, que variaram de 3 mg/mL a 40 mg/mL, indicando a presença de sinergismo entre os compostos presentes no alecrim.

Os menores valores de CIM encontrados neste trabalho podem ser explicados pela grande variação da composição química dos produtos do alecrim, o que explica também a grande variedade de resultados encontrados na literatura. A ORA utilizada neste trabalho tem um percentual de ácido carnósico a 8,1% (Anexo 1). No entanto, não foram apresentados cromatogramas, que poderiam ajudar na inferência de seus componentes químicos. Ojeda-sana, A.M., *et al.*, (2013) em seu estudo produziu dois óleos de alecrim, um rico em mirceno e outro em α -pineno, sendo o rico em α -pineno mais eficaz em sua capacidade antibacteriana e capaz de inibir o crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae*. Em geral, as bactérias Gram-negativas são menos sensíveis devido a presença de membrana externa à parede celular, que dificulta a passagem de compostos hidrofílicos pela camada de lipopolissacarídeos (LPS) (Vaara, M., 1992).

Além das bactérias envolvidas no processo de infecção secundária nas queimaduras, a ORA foi eficaz contra bactérias envolvidas em infecções odontogênicas, principalmente levando em consideração a atividade bactericida da óleo-resina para *S. mutans*, principal agente cariogênico. Um estudo de Somas, K.T.; Anitha, R.; Lakshmi, D. (2019) também relatou atividade de ORA a 1% em nanopartículas de prata contra *S. mutans*.

Em relação à CBM da ORA, foi constatado uma atividade bacteriostática frente todas às espécies bacterianas testadas no valor de CIM. Tal fato diverge de trabalhos da literatura em que foram relatadas atividades bactericidas (Stojiljkovic, J.

et al., 2018), mas este fato pode ser explicado pelas menores concentrações de ORA utilizados no presente estudo.

Em relação à atividade antifúngica da ORA, não foi possível determinar a CIM, mesmo em concentrações maiores que as apresentadas nos resultados encontrados na literatura, onde mostraram uma CIM do OEA de 2,73 mg/mL para *C. tropicalis* e 1,91 mg/mL para *C. albicans* (Karpinski, T. *et al.*, 2023). A divergência encontrada pode ser resultado da diferença na estrutura química de óleo-resinas e óleos essenciais com origens distintas.

Assim, pode-se considerar os óleos de alecrim como agentes antimicrobianos eficazes na inibição do crescimento de microrganismos de importância clínica e relevância mundial, principalmente aqueles relacionados aos processos infecciosos em queimaduras.

5.1.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Microbicida Mínima (CMM) da quitosana

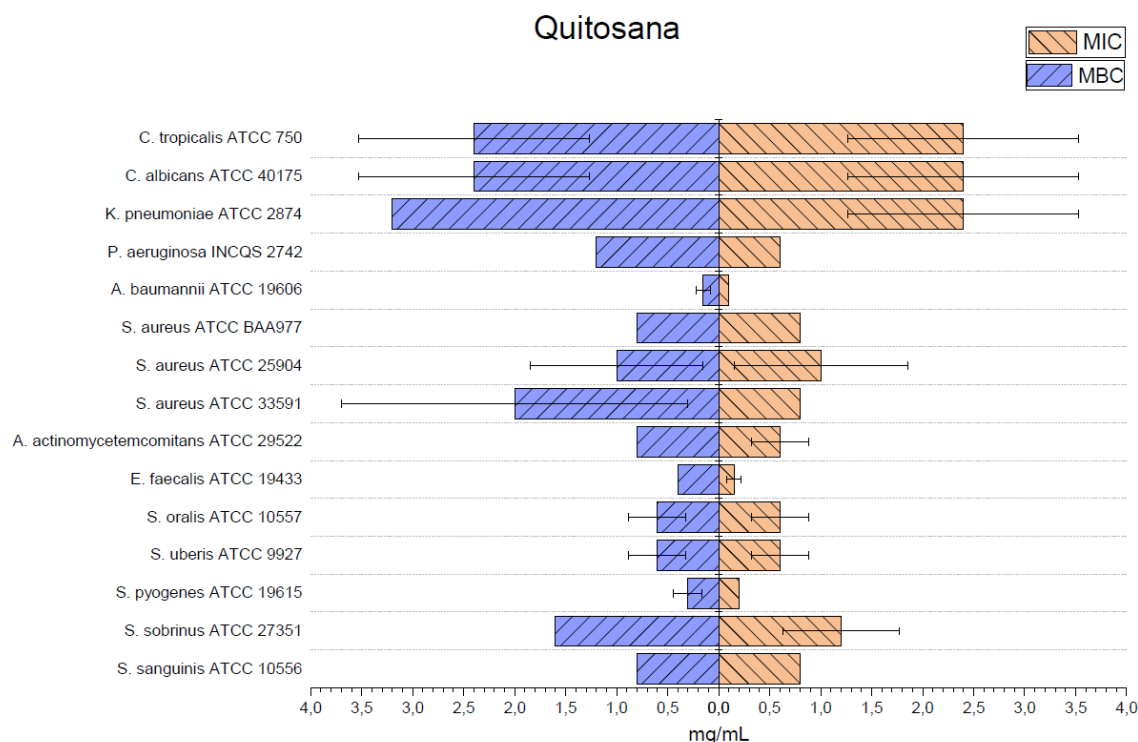
A quitosana e sua atividade antimicrobiana tem sido explorada devido a sua significativa eficácia na inibição de uma vasta quantidade de espécies de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus. Sua atividade antimicrobiana é associada às suas propriedades físico-químicas e bem explorada por muitos autores, sendo um polímero muito utilizado em formulações tópicas (Gomes, T.V. *et al.*, 2023).

A atividade antibacteriana da quitosana é considerada de amplo espectro, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com enfoque para Gram-negativas, as quais autores sugerem maior suscetibilidade devido a maior presença de cargas negativas em sua parede celular, interagindo mais intensamente com as cargas positivas da quitosana (Cai-Ling, K. *et al.*, 2021).

Em relação aos microrganismos mais intimamente relacionados aos processos infecciosos em queimaduras, foi possível a confirmação de sua atividade antimicrobiana no presente estudo (Figura 6), onde as bactérias *A. baumannii* ATCC 19606 e *P. aeruginosa* apresentaram valores de CIM de 0,1 mg/mL e 0,6 mg/mL, respectivamente. Baixos valores de CIM para a quitosana foram detectados tanto para as bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas testadas, apresentando valor de CIM de 0,1 mg/mL para *E. faecium*, Gram-positiva, tanto para *A. baumannii*,

Gram-negativa. Costa, E.M. *et al.* (2017) reportou valores de CIM semelhantes para *A. baumannii*, variando de 0,16 mg/mL a 0,31 mg/mL. Já as estirpes de *S. aureus*, apresentaram valores de CIM menores para *S. aureus* sensível (1,0 mg/mL) em relação à estirpe resistente (2,0 mg/mL).

Figura 6: valores de CIM e CBM da quitosana frente aos microrganismos testados.



Fonte: elaborada pela autora (2023).

Considerando a atividade antifúngica da quitosana, nesse estudo ela apresentou valores de CIM maiores para a amostra de *C. albicans* ATCC 40175 (2,4 mg/mL) em relação à sua amostra hospitalar (1,2 mg/mL), que se assemelha aos valores encontrados Tayel, A.A. *et al.*, (2010).

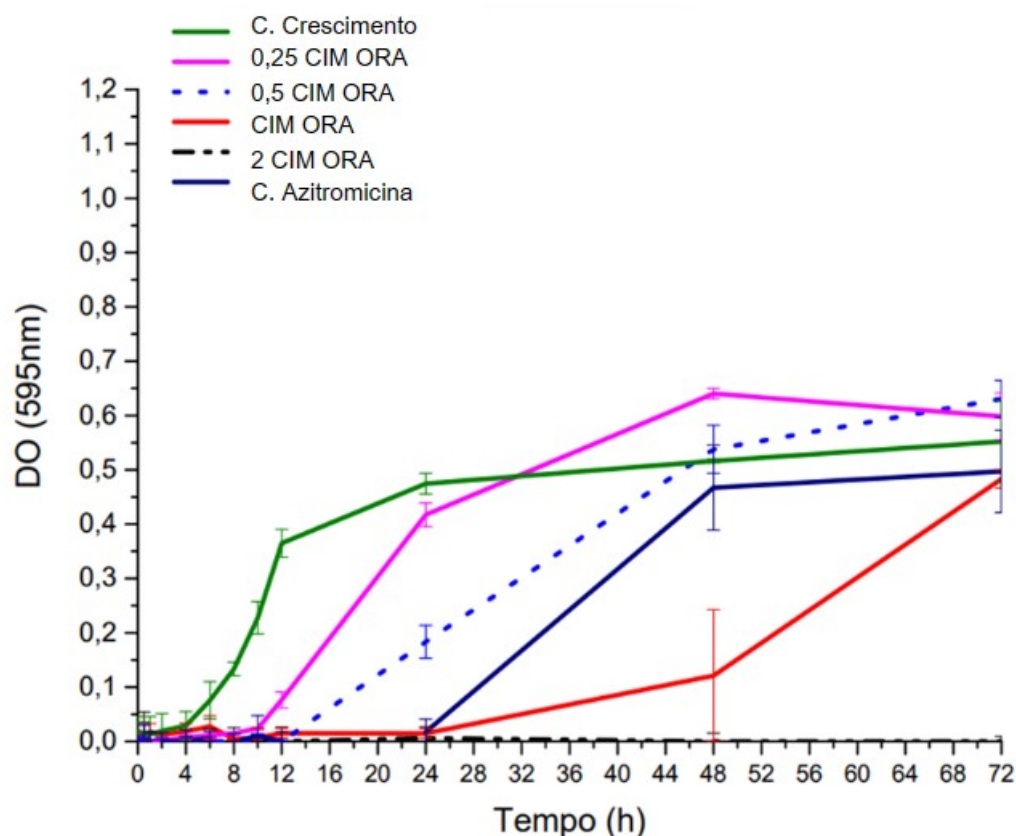
No que diz respeito à CMM, a quitosana se mostrou microbicida para todas as espécies testadas, apresentando menores valores para a bactéria *A. baumannii* ATCC 19606 (0,15 mg/mL) e maiores valores de CIM para *C. albicans* ATCC 40175, sendo estes iguais ao valor de CIM. Esses resultados contrastaram com os dados de Sobhani, Z. *et al.*, (2017), no qual foram encontrados efeitos bacteriostáticos para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Portanto, a incorporação de compostos bioativos na formulação proposta pode ser uma estratégia promissora para o controle de infecções em queimaduras, considerando o potencial sinérgico da ORA e quitosana, ampliando seus efeitos biológicos.

5.1.3 Cinética de morte

Estudos de cinética de morte são frequentemente utilizados na pesquisa com novos antimicrobianos (Vincent, H. *et al*, 2005). Eles oferecem dados para investigação do comportamento do microrganismo em relação ao tempo de exposição ao agente. Para a estirpe *S. aureus* ATCC 33591, MRSA, foi observado que a ORA na concentração de CIM (312,5 µg/mL) foi capaz de inibir a fase log durante todo o tempo de estudo, conforme ilustrado na Figura 7. Porém, a partir das 24 h, foi identificado uma tendência a cair o crescimento no controle e aumentar o crescimento frente às concentrações de ORA diferentes do CIM e de azitromicina.

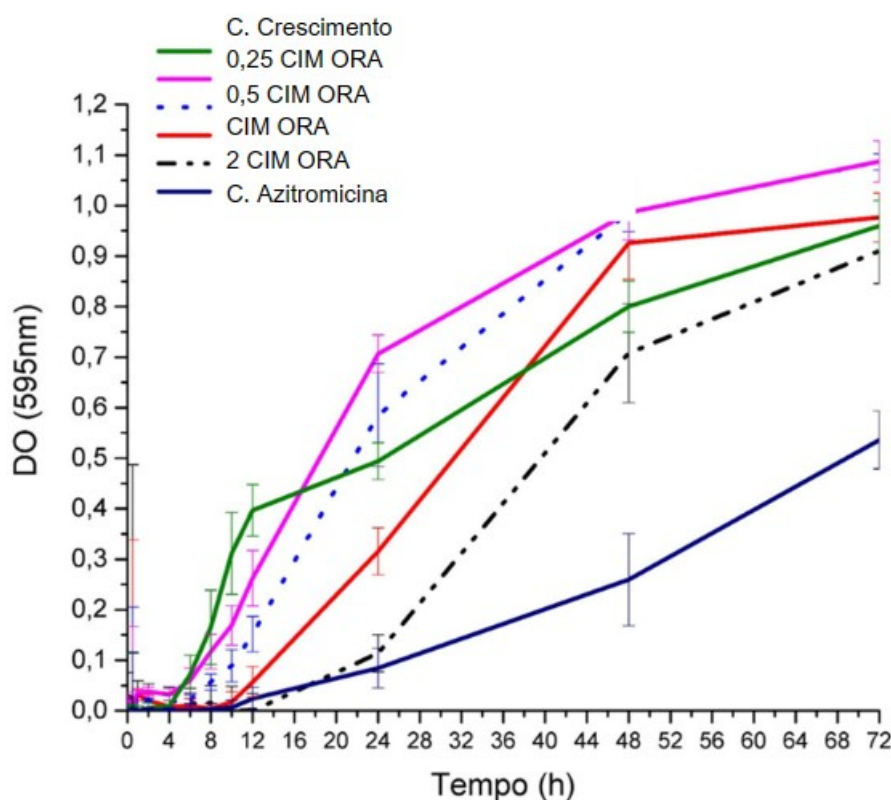
Figura 7: gráfico da curva de morte para *S. aureus* MRSA ATCC 33591, na presença de diferentes concentrações de ORA. Estão apresentados também o controle de crescimento e o controle de atividade azitromicina (0,4 mg/mL).



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Para a estirpe de *S. aureus* 25904, considerada não resistente, pôde ser observado que a ORA na concentração de CIM (312,5 µg/mL) foi capaz de atrasar a fase log em 6 horas, como mostra a Figura 8. Porém, a partir das 12 h, foi observado a mesma tendência do que para a estirpe de *S. aureus* 33591, com o microrganismo entrando na fase de declínio no controle de crescimento, e voltando a se multiplicar frente às concentrações de ORA. Entretanto, para esta estirpe, a ORA foi menos eficiente, já que mesmo na concentração de duas vezes o valor de CIM foi possível a bactéria voltar a crescer após 12h.

Figura 8: gráfico da curva de morte para *S. aureus* sensível ATCC 25904 na presença de diferentes concentrações de ORA. Estão apresentados também o controle de crescimento e o controle de atividade azitromicina (0,006 mg/mL).



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Esmael, A. *et al* (2020) realizou estudos de curva de morte de óleo de alecrim para microrganismos resistentes a antimicrobianos, entre eles *S. aureus*. Seu estudo demonstrou uma atividade bactericida frente a esse microrganismo após 6 horas de incubação. Além dos autores utilizarem concentrações superiores (variando de 0,5 a 5,0 g/mL) as testadas no presente trabalho, a composição química dos óleos exerce um grande impacto na eficácia e no tempo de ação em um microrganismo (May, J. *et al.* (2000), o que pode explicar os resultados divergentes. Um estudo em que foi testada a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* frente ao α -pineno isolado, demonstrou um efeito bacteriostático como os encontrados neste trabalho (Eduardo, L.S. *et al.*, 2018).

A cinética de morte para as espécies de *S. aureus* mostraram que a ORA poderia se comportar em um curativo, como um bom efeito antibacteriano, visto o atraso da fase log encontrado. Considerando-se os resultados encontrados, pode-se propor a hipótese de que o filme deveria ser trocado pelo menos 2 vezes ao dia já que o atraso no crescimento foi de no mínimo 6 h na concentração de CIM.

Um outro fator a ser destacado é a sensibilidade de *S. aureus* MRSA frente à ORA, diferentemente à estirpe sensível. Isso pode ser explicado pelo fitness gasto pelas bactérias na resistência contra antimicrobianos clássicos, podendo deixá-las mais susceptíveis a substâncias antimicrobianas alternativas (Lenski, R.E., 1998). As linhagens *S. aureus* MRSA são classicamente resistentes aos β -lactâmicos, porém muito isolados mostram resistência a antimicrobianos de outras classes também, o que leva a poucas opções de tratamento.

Compostos naturais exibem amplo espectro de atividade antimicrobiana e agem em células microbianas por variados mecanismos de ação. A suscetibilidade de estirpes multidrogas-resistente (MDR) aos fitoquímicos pode ser explicada pelos mecanismos de sobrevivência sofisticados desenvolvidos, devido à pressão seletiva que as plantas sofreram ao longo do tempo (Simões, M.; Bennett, R.N.; Rosa, E.A.S., 2008). Além disso, estudos indicam que plantas aromáticas da família Lamiaceae exibem baixo risco de resistência e baixa toxicidade para humanos (Nieto, G., 2017). Para traçar uma relação entre os efeitos observados e a composição química da ORA, mais estudos precisam ser realizados. Assim, substâncias bioativas naturais podem ser eficazes para contornar os mecanismos de resistência e considerando que infecções hospitalares causadas por *S. aureus* MRSA no contexto das queimaduras sejam frequentes, a ORA mostrou-se um agente promissor.

5.2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES À BASE DE QUITOSANA COM INCORPORAÇÃO DE ORA

5.2.1 Formulação dos filmes

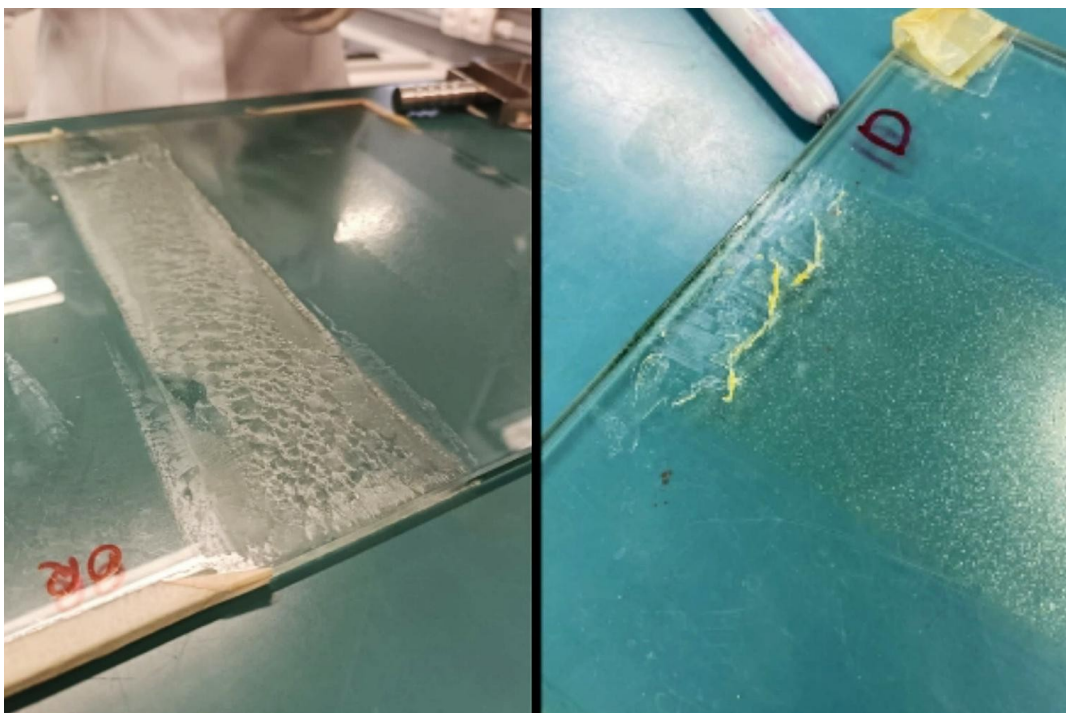
A pesquisa e o desenvolvimento de filmes bioativos como curativos para feridas tiveram um avanço significativo nas últimas décadas. Entretanto, um conjunto de necessidades deve ser atendido para que um filme seja eficaz, estimulando o processo de reepitelização, como a formação de barreira impermeável contra microrganismos, elasticidade, resistência, absorção do fluido liberado pelas feridas e aderência às lesões (Agarwal, A., 2011). Filmes poliméricos formulados à base de quitosana, considerada um biopolímero seguro, biodegradável, não tóxico e com

boas atividades bacteriostáticas e cicatrizantes, podem ser ideais para regeneração de lesões (Shi, C. *et al.*, 2006).

O estudo de Labib, R.M. *et al.* (2019), também utilizou a quitosana para preparar filmes com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e *R. officinalis*, mostrando que a quitosana associada com compostos naturais que possuem atividades biológicas melhoram a reepitelização e regeneração normal da pele no caso de feridas abertas, além de diminuir o estresse oxidativo na área afetada, representando então uma abordagem promissora para o desenvolvimento de terapias significativas no tratamento das queimaduras. No entanto, o objetivo dos autores foi a de comparar a ação dos diferentes óleos essenciais nas propriedades discutidas, além de utilizarem concentrações de óleos superiores (10,0%) as utilizadas neste trabalho.

A formulação F1 não foi capaz de formar o filme pois a quitosana a 1% não levou à viscosidade necessária, tornando difícil o processo de laminação (Figura 9 – à esquerda) e conferindo aspecto craquelado após a secagem. A lecitina de soja utilizada como emulsificante na F1 também não se dissolveu por completo, formando grumos no filme. A F2 não formou filme no laminador (Figura 9 – à direita), mas formou quando vertida em placa de *petri* após secagem em um volume de 3 mL. Porém, a lecitina de soja também não se dissolveu, formando ainda grumos pelo filme (Figura 10).

Figura 9: formulações F1 laminada – à esquerda e F2 laminada – à direita.



Fonte: Acervo pessoal (2023).

Figura 10: formulação F2 em placa de *petri*.

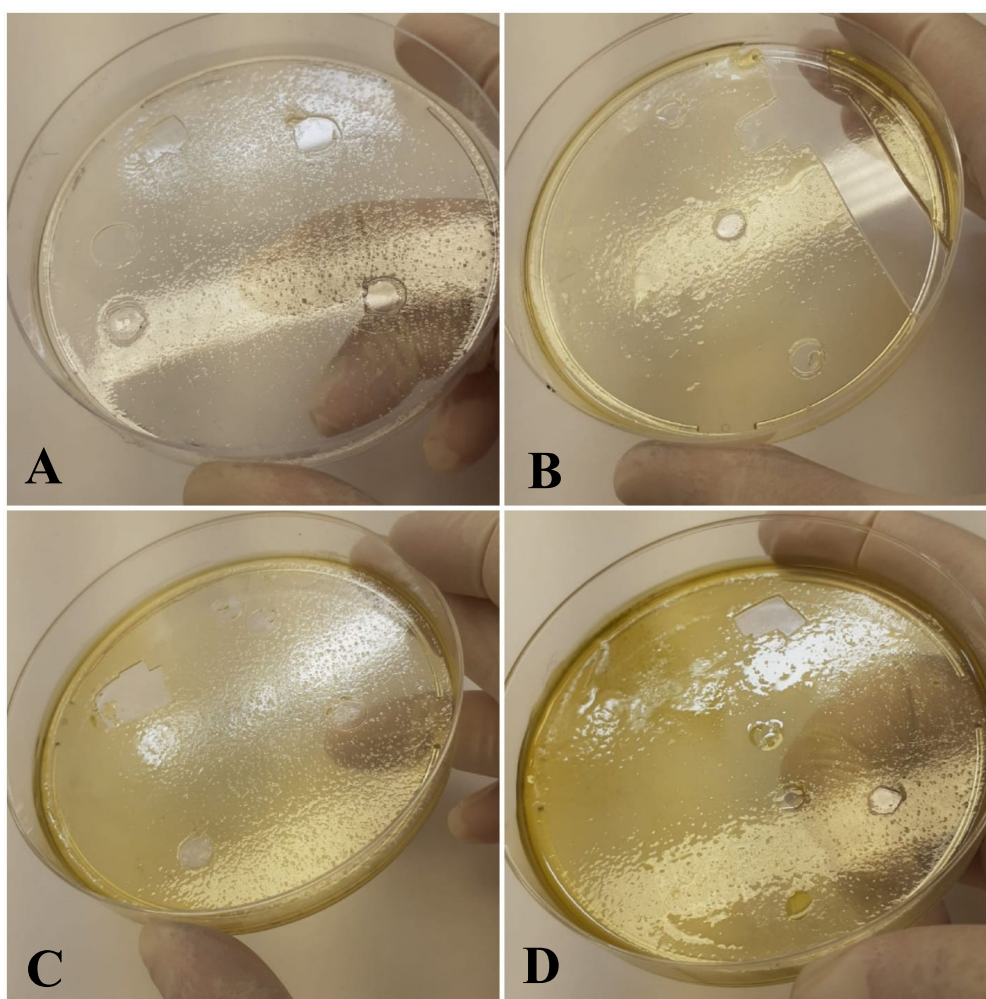


Fonte: Acervo pessoal (2023)

Para as formulações seguintes, o uso de placas de *petri* foi adotado em detrimento do laminador, visto que o filme não se aderiu corretamente à superfície

dele. Em relação a F3, os filmes foram formados após o processo de secagem e, dessa vez, a ORA foi bem emulsificada pelo *Tween* 80, mesmo a concentrações maiores (1,0%, 2,5% e 5,0%) que as utilizadas nas formulações seguintes. Em relação às características macroscópicas, o filme ficou com uma coloração verde-claro e com odor agradável, característico da ORA. Os filmes resultantes ficaram homogêneos, porém com a presença de pequenas irregularidades na superfície (Figura 11).

Figura 11: formulação F3.



A: filme branco; B: filme 1,0% ORA; C: filme 2,5% ORA; D: filme 5,0% ORA.

Fonte: acervo pessoal (2023).

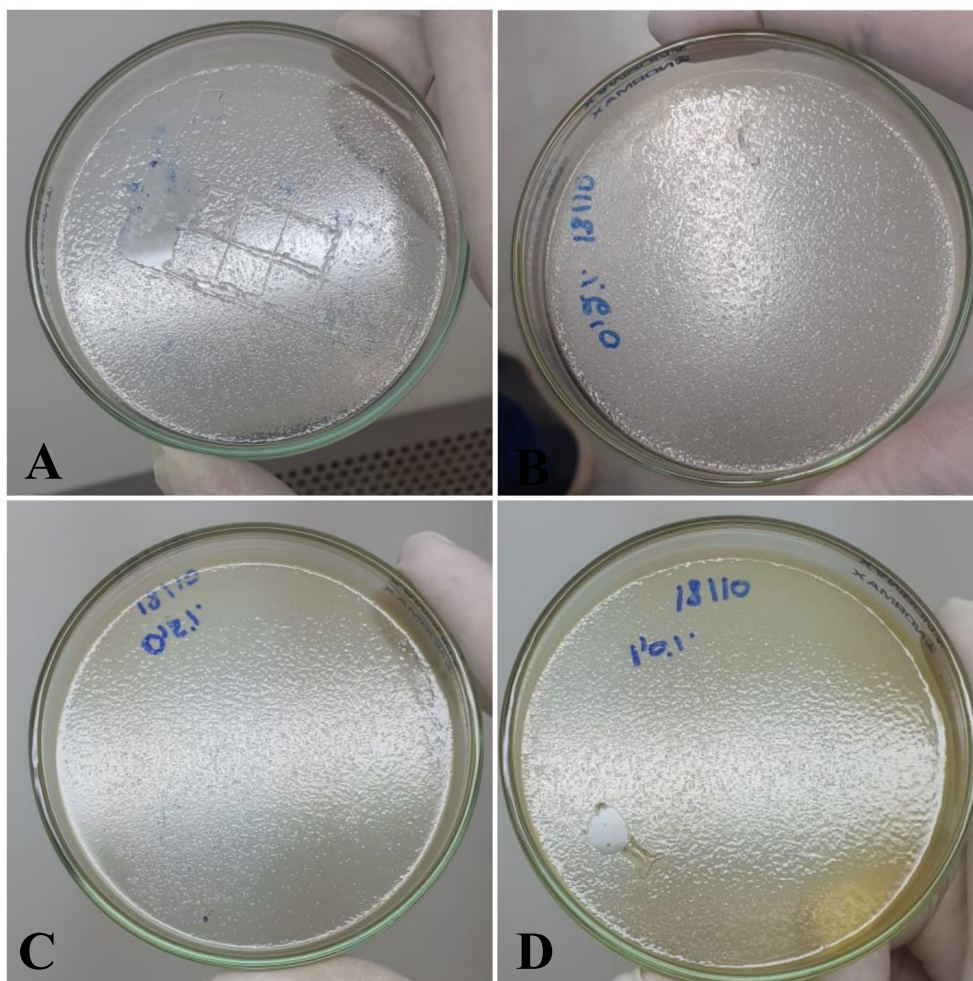
A fim de diminuir a tensão superficial das soluções nas placas, a F4 foi vertida em placas de *petri* de vidro, que além de possuírem maior resistência térmica, importante para o processo de secagem, confere uma tensão superficial menor nas

soluções devido sua superfície lisa e não porosa, que contrasta com as placas de poliestireno, que são porosas e hidrofóbicas (Faghihnejad, A.; Zeng, H., 2012). As características da F4 e F5 foram bem semelhantes, uma vez que nelas a concentração utilizada de ORA era a mesma (0,2%, 0,5% e 1,0%), apresentando o mesmo odor, mesma coloração e aparência superficial semelhantes, ambos menos intensos que na F3 (Figuras 12 e 13). Além disso, a coloração desses filmes apresentaram um tom de transparência, que ajudaria no acompanhamento visual da ferida, sem a necessidade de retirar o filme (Agarwal, A., 2011).

Comparando às formulações F3, F4 e F5, foi possível observar uma flexibilidade maior dos filmes da F3. Já os filmes contendo ORA em comparação com os filmes brancos das últimas 3 formulações também apresentaram maior flexibilidade e hidratação, aumentando conforme a adição de ORA, sendo os filmes com maiores concentrações (1,0%, 2,5% e 5,0%) os mais fáceis de manusear.

Sabe-se que o grau de hidratação de uma solução interfere na sua maleabilidade e flexibilidade, sendo quanto maior, possivelmente mais maleável a amostra será (Yakimets, I. *et al*, 2007). No entanto, o teor de moléculas de água nos filmes formulados não variaram no volume de água, o que leva a inferência de que o teor de óleo-resina também influencia nessas propriedades de uma determinada amostra.

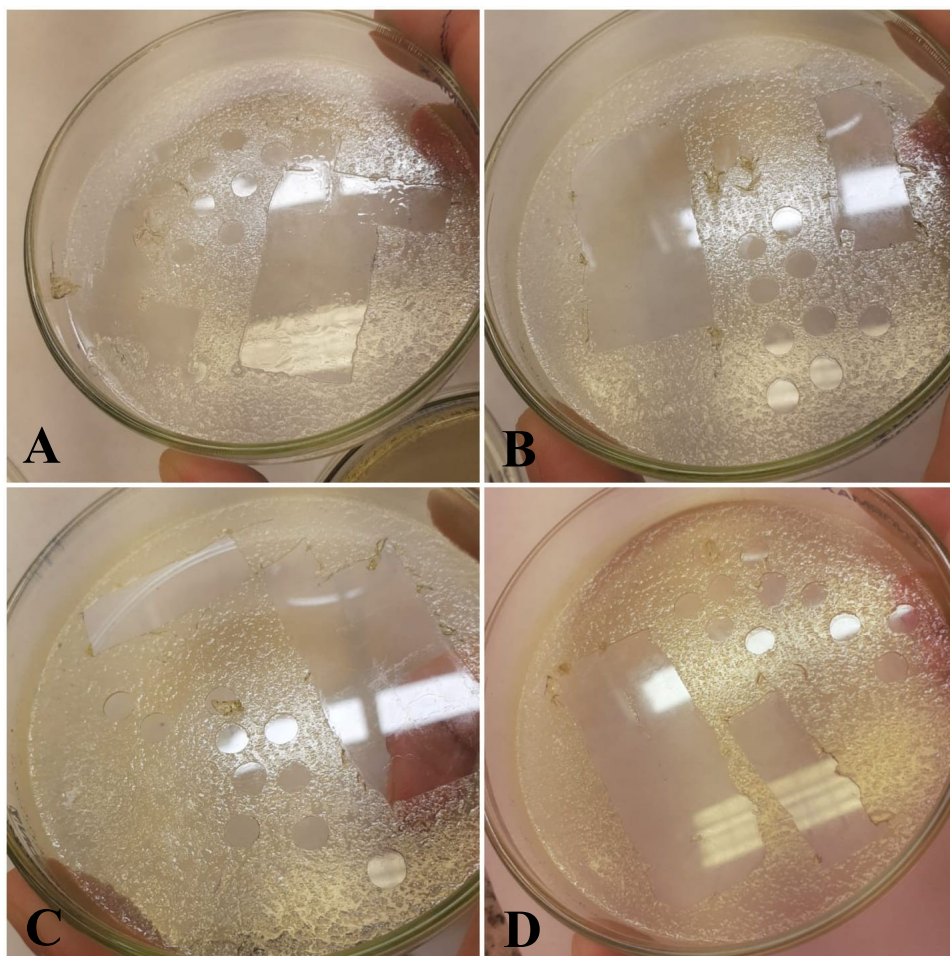
Figura 12: formulação F4.



A: filme branco; B: filme 0,2% ORA; C: filme 0,5% ORA; D: filme 1,0% ORA.

Fonte: acervo pessoal (2023).

Figura 13: formulação F5.



A: filme branco; B: filme 0,2% ORA; C: filme 0,5% ORA; D: filme 1,0% ORA

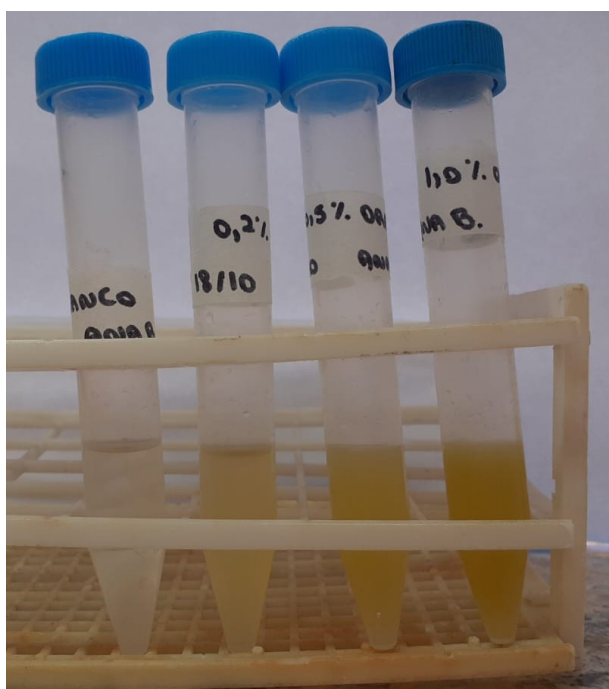
Fonte: acervo pessoal (2023).

5.2.2 Determinação do Potencial Zeta (PZ) e determinação do Diâmetro Hidrodinâmico médio (DHm) das partículas das soluções precursoras dos filmes

As emulsões de óleo em água se constituem na dispersão de gotículas do óleo em um meio aquoso e a adição de emulsificante possibilita a adsorção na interface óleo-água e reduz a tensão superficial, mantendo as gotículas estáveis devido a suas altas cargas superficiais, levando a uma maior estabilidade a longo prazo (Lam, S.; Velikov, K.; Velev, O., 2014; Roy, J.C. *et al*, 2017). A medida de PZ se relaciona com a estabilidade de uma solução pela avaliação das cargas elétricas de suas partículas suspensas, sendo quanto maior a carga elétrica, maior a frequência de oscilação das partículas no ensaio e maior o PZ da solução. Valores de PZ próximos de ± 30 mV indica uma suspensão estável, evitando agregação de seus compostos (Sganzerla, W.G *et al*, 2023).

As soluções precursoras dos filmes (Figura 14) neste trabalho foram avaliadas a fim investigar as interações que os constituintes da formulação apresentaram. As soluções exibiram valores altos de PZ, conforme indicado na tabela 3, indicando estabilidade da emulsão. Além disso, os valores positivos encontrados podem ser atribuídos a presença do agrupamento amino das moléculas de quitosana (CARVALHO, F.G. *et al*, 2019) e a presença de ácidos na composição química da ORA. É interessante notar que o PZ das soluções aumenta conforme o aumento da concentração de ORA, aumentando a estabilidade delas. Esse aumento provavelmente está relacionado à componentes presentes em sua composição química, como ácidos fenólicos, que podem afetar o pH da solução, influenciando as cargas superficiais das partículas (Mena, P. *et al*, 2016).

Figura 14: soluções precursoras dos filmes da F4.



Fonte: acervo pessoal (2023).

Tabela 3: PZ e DHm das soluções precursoras dos filmes referente à F4.

	Branco	0,2% ORA	0,5% ORA	1,0% ORA
Potencial Zeta (mV)	42,30 ± 1,20	46,10 ± 3,03	45,40 ± 1,59	49,80 ± 1,04

Diâmetro	70,40 ±	410,05 ±	441,40 ±	1214,00 ±
Hidrodinâmico médio (nm)	7,27	63,00	46,13	41,22

Fonte: elaborado pela própria autora (2023).

O tamanho das partículas em uma solução é também de extrema importância para a caracterização físico-química de formulações. A técnica de DLS utilizada neste trabalho é muito utilizado no controle de qualidade em indústrias que produzem produtos coloidais e polímeros. Ela mede o tamanho das partículas com base na flutuação que elas apresentam em sua trajetória depois que um feixe de *laser* é direcionado para a amostra. Quanto mais lentas as flutuações, maior o seu DHm (Bhattacharjee, S., 2016). No presente trabalho, essa técnica foi utilizada para avaliar o tamanho das partículas da formulação na presença e na ausência de ORA. Pode-se observar que o tamanho das partículas da solução aumenta conforme o aumento da concentração de ORA nos filmes. Embora o aumento do tamanho das partículas possa resultar em maior probabilidade de aglomeração, neste trabalho é possível verificar que o aumento do tamanho das partículas é compensado pelo aumento de carga. Assim, as cargas mantêm as partículas grandes em movimento.

5.2.3 Avaliação dos parâmetros de qualidade dos filmes formulados

5.2.3.1 Avaliação da estabilidade dos filmes ao processo de secagem

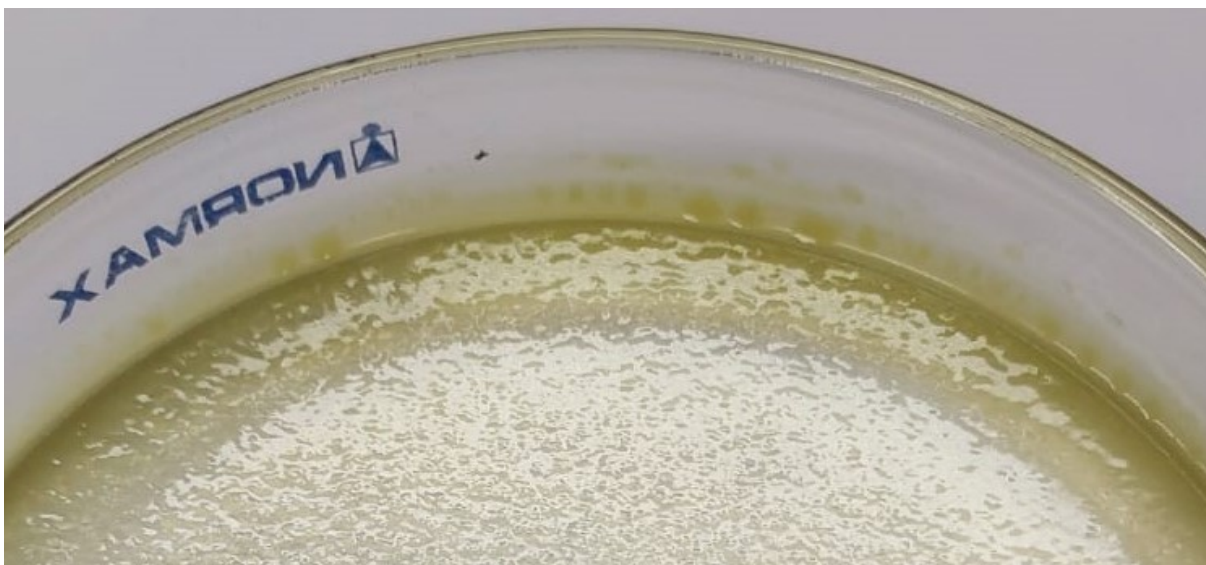
Os filmes formulados foram avaliados em diferentes condições de temperatura a fim de avaliar o comportamento do gel durante sua secagem. A presença de bolhas em filmes poliméricos é um aspecto muito comum e negativo, à medida que elas podem reduzir a eficácia do filme, diminuir sua adesão e aumentar o risco de contaminação microbiana (Pourdarvish, R.; Danner, R.P.; Larry, J.D., 2008). Um dos fatores que podem influenciar o surgimento de bolhas é a remoção brusca do solvente durante a secagem, especialmente empregando altas temperaturas, como 50 °C, considerando a temperatura ambiente, na qual os filmes são formulados.

Outro aspecto importante é a rugosidade e a aspereza que comumente aparece nas superfícies dos filmes formulados pela técnica de evaporação do solvente. Isso acontece devido a uma instabilidade do sistema e ao tempo de nivelamento, que é muito grande quando se compara à evaporação normal do solvente. Além disso, a rápida evaporação faz com que as soluções tenham grandes ângulos de contato em relação ao substrato, o que também gera irregularidades na superfície (Strawhecker, K.E.; Kumar, S.K., 2001). No entanto, Pereira, G.G. *et al.* (2014) em seus estudos produziu filmes que apresentaram uma superfície mais rugosa, com depressões frequentes e de tamanhos pequenos, e chamou atenção que uma superfície porosa dos filmes ajuda a ter uma maior superfície de contato com a ferida, o que causaria uma liberação mais imediata dos ativos e uma absorção mais eficientes dos exsudatos.

Nesse contexto, a F2 apesar de ter sido seca em temperatura ambiente, seu volume contido na placa era consistentemente menor (3 mL). Já os filmes da F3, inicialmente secos em temperatura ambiente, foram transferidos para a estufa a 50 °C após 3 dias devido ao seu aspecto ainda molhado, sugerindo que secagem à temperatura ambiente pode não ter sido eficaz na remoção completa do solvente devido ao maior volume na placa (12 mL).

A fim de diminuir os aspectos da secagem brusca dos filmes, a F4 foi submetida à secagem em estufa a 35 °C por 5 dias, porém outros problemas apareceram, como a possível quebra de emulsão durante o processo, evidenciado pelas gotículas de ORA nas bordas do filme (Figura 15). A quebra de emulsão pode acontecer quando as condições de armazenamento de uma formulação não são adequadas, e o calor dos 5 dias de secagem influenciou na estabilidade da emulsão, ocorrendo possíveis quebras entre as ligações dos constituintes (Tadros, T.F., 2016).

Figura 15: Gotículas de ORA na borda do filme 1,0% ORA da F4.



Fonte: acervo pessoal (2023).

Por fim, a F5 foi acondicionada em estufa a uma temperatura de 60 °C em um período de 12 h. Os filmes apresentaram aspecto seco, com cores, odores e maleabilidade semelhantes à F4. No entanto, foi detectada a presença de mais irregularidades nas superfícies que às formulações anteriores, indicando que a secagem abrupta em temperaturas mais altas influencia na uniformidade da superfície ao final do processo (Figura 16).

Figura 16: recorte da F5 evidenciando suas irregularidades.



Fonte: acervo pessoal (2023).

5.2.3.2 Determinação do peso médio e espessura dos filmes

A determinação do peso médio e espessura de filmes empregados na área médica é de suma importância, visto que indicam se há uniformidade na distribuição dos constituintes das formulações (Sobral, P.J.A., 1999). Além disso, é ideal no contexto das feridas por queimaduras que os filmes apresentem menores espessuras, como 0,05 a 2 mm, devido à sensibilidade da pele queimada (Agarwal, A. *et al.*, 2011; Moraes, D.C.M. *et al.*, 2013).

No trabalho em questão, a formulação F2 em placa de *petri* apresentou a menor espessura medindo $0,08 \text{ mm} \pm 0,03 \text{ mm}$, o que está semelhante ao trabalho de Pereira, G.G. *et al.* (2014) em que filmes com *Aloe vera* e vitamina E tiveram espessura de 0,08 mm. Os valores de peso médio e espessura das formulações F3, F4 e F5 estão expressos nas Tabelas 4, 5 e 6. É possível observar um aumento da espessura com o aumento da concentração de ORA empregada para todas elas, assim como encontrados no trabalho de Silva, A.C (2022), que demonstrou que a concentração de bioativos quando incorporados às formulações podem influenciar nessas propriedades físicas.

Tabela 4: valores de peso médio e espessura da F3.

F3				
	Branco	1,0% ORA	2,5% ORA	5,0% ORA
Peso médio (mg)	$20,0 \pm 10,0$	$20,0 \pm 10,0$	$30,0 \pm 10,0$	$40,0 \pm 10,0$
Espessura (mm)	$0,1 \pm 0,03$	$0,1 \pm 0,07$	$0,2 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0,08$

Fonte: elaborada pela própria autora (2023).

Tabela 5: valores de peso médio e espessura da F4.

F4				
	Branco	0,2% ORA	0,5% ORA	1,0% ORA
Peso médio (mg)	$20,0 \pm 7,0$	$23,0 \pm 10,0$	$24,0 \pm 9,0$	$24,0 \pm 7,0$
Espessura (mm)	$0,1 \pm 0,03$	$0,1 \pm 0,05$	$0,1 \pm 0,05$	$0,1 \pm 0,03$

Fonte: elaborada pela própria autora (2023).

Tabela 6: valores de peso médio e espessura da F5.

F5				
	Branco	0,2% ORA	0,5% ORA	1,0% ORA
Peso médio (mg)	20,0 ± 12,0	22,0 ± 9,0	29,0 ± 13,0	30,0 ± 8,3
Espessura (mm)	0,1 ± 0,05	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,05	0,1 ± 0,03

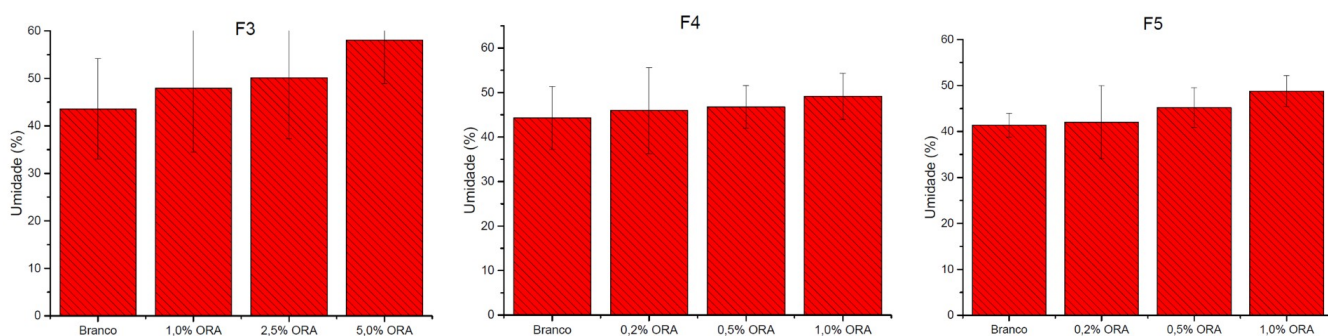
Fonte: elaborada pela própria autora (2023).

5.2.3.3 Determinação do teor de umidade

Para que um curativo ajude na cicatrização de feridas, é necessário que ele mantenha a umidade e o balanço de água entre o filme e a ferida, além de permitir a troca de gases e absorver o excesso de fluido das feridas (Kennedy, J.F.; Knill, C.J.; Thorley, M., 2011). Feridas consideradas crônicas estagnam em um processo inflamatório e produzem exsudatos por algum tempo. Por isso, filmes curativos precisam absorver esse fluido e ao mesmo tempo manter o nível normal de hidratação de um tecido, principalmente no caso de queimaduras com espessura parcial (Agarwal, A., 2011) e a medida do teor de umidade é especialmente relevante nesses casos.

O teor de umidade das formulações F3, F4 e F5 está apresentado na figura 17. Os valores variaram de 41,37% a 58,05%, indicando um alto teor de umidade quando comparado com o trabalho de Silva, A.C. (2022), que apresentou valores máximos de 30,68% de umidade. Além disso, é possível verificar que quanto mais alta a concentração de ORA empregada, maior o teor de umidade do filme, assim como encontrado no mesmo trabalho de Silva, A.C. (2022), no qual filmes com maior concentração de extrato apresentavam também mais umidade.

Figura 17: teor de umidade das formulações F3, F4 e F5.



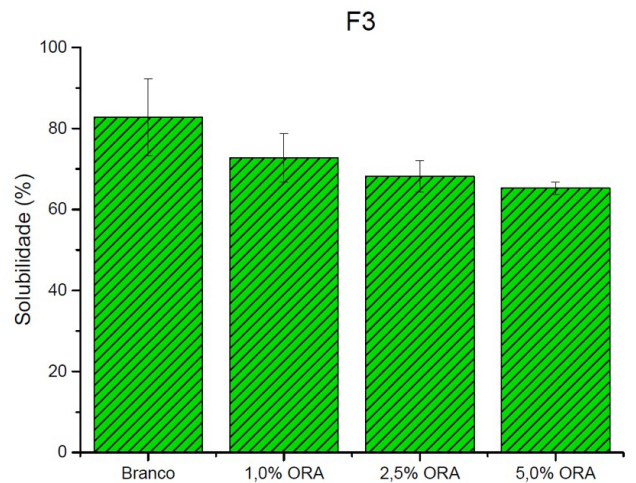
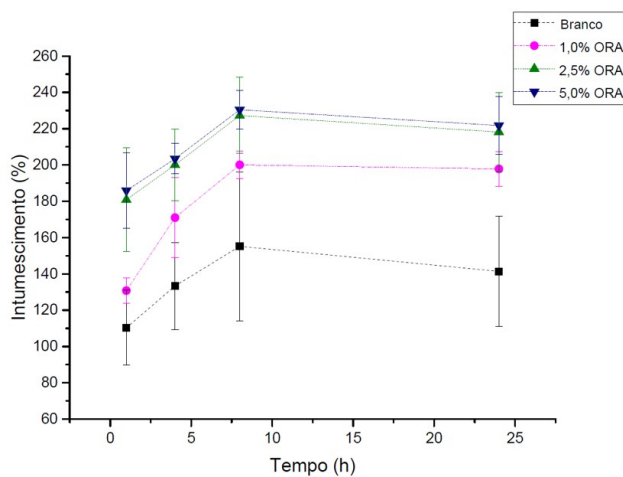
Fonte: elaborada pela autora (2023).

Os altos valores de teor de umidade encontrados se assemelham com os encontrados por Monterrey, E.S; Sobral, P.J.A. (1999), que utilizaram uma temperatura no ensaio de umidade maior (95 °C) que a utilizada por Silva, A.C. (60 °C), assim como a utilizada no presente trabalho, na qual a estufa foi programada a 100 °C, o que pode explicar essa variação. Assim, os resultados encontrados neste estudo mostram que os filmes apresentam capacidade de fornecer umidade a ferida, o que corresponde ao esperado para uma melhor cicatrização.

5.2.3.4 Determinação do grau de intumescimento e solubilidade

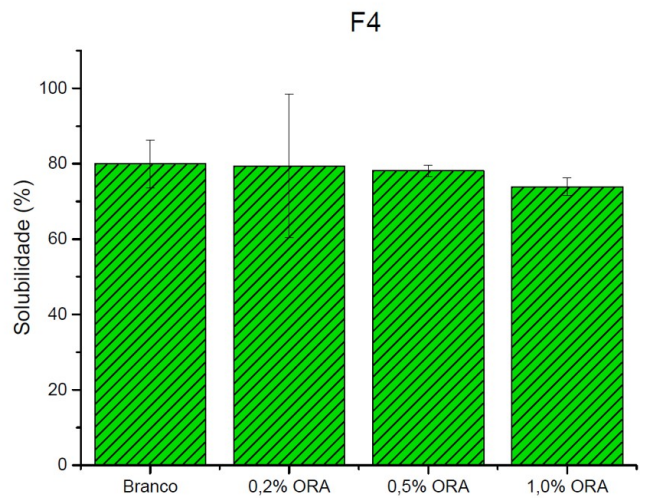
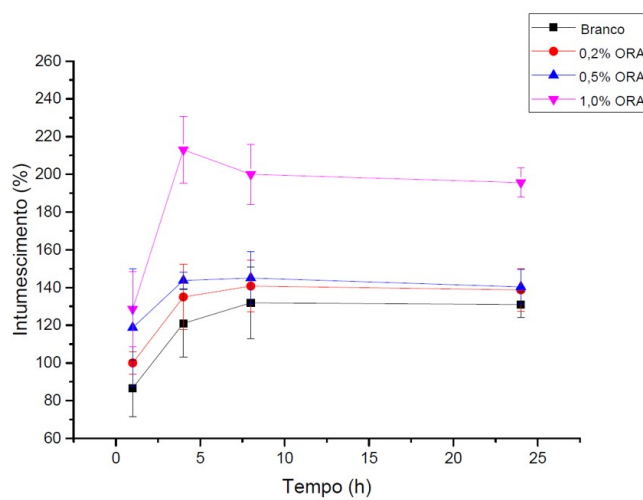
A capacidade de um filme tópico curativo de reter exsudatos de uma ferida, ou seja, seu grau de intumescimento, é uma medida importante e já discutida neste trabalho. Dependendo do polímero empregado na formulação, pode-se obter variadas porcentagens de absorção de exsudatos, influenciando na sua capacidade adesiva, o que vai determinar uma adesão bem-sucedida na ferida e o tempo de permanência no local aplicado (Costa, N.N. *et al.*, 2020). Já o grau de solubilidade indica a porcentagem de solubilização dos constituintes no filme e a integridade física desse filme em lesões (Jaiswal, L.; Shankar, S.; Rhim, J.H., 2019). Assim, o grau de intumescimento e solubilidade são métricas que medem a funcionalidade de um filme curativo. As porcentagens de intumescimento e solubilidade dos filmes formulados de acordo com as formulações F3, F4 e F5 deste trabalho estão apresentadas nas figuras 18, 19 e 20, respectivamente.

Figura 18: porcentagem de intumescimento dos filmes ao longo do tempo e solubilidade da F3.



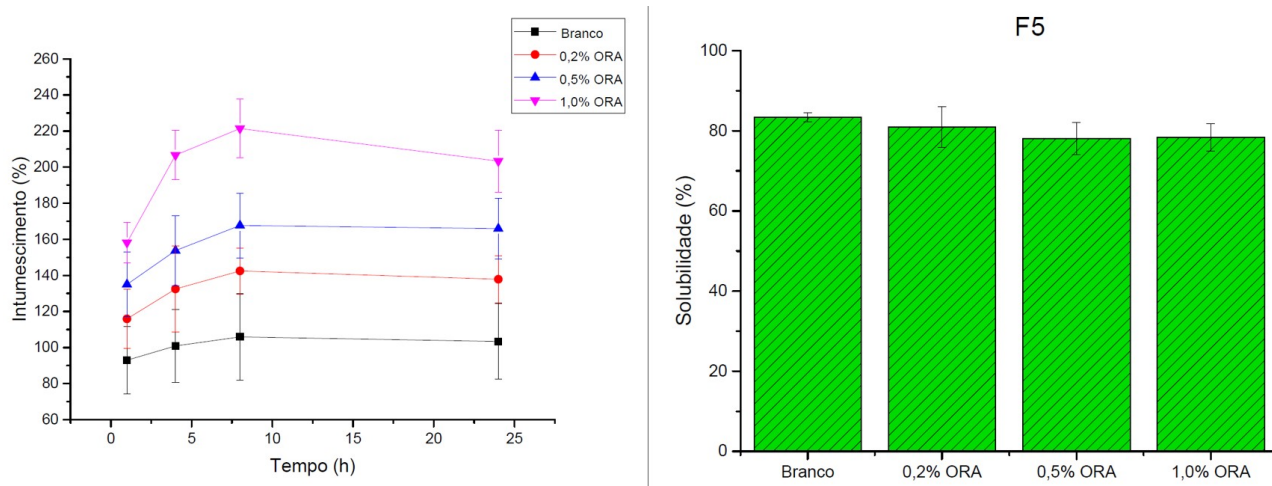
Fonte: elaborado pela própria autora (2023).

Figura 19: porcentagem de intumescimento dos filmes ao longo do tempo e solubilidade da F4.



Fonte: elaborado pela própria autora (2023).

Figura 20: porcentagem de intumescimento dos filmes ao longo do tempo e solubilidade da F5.

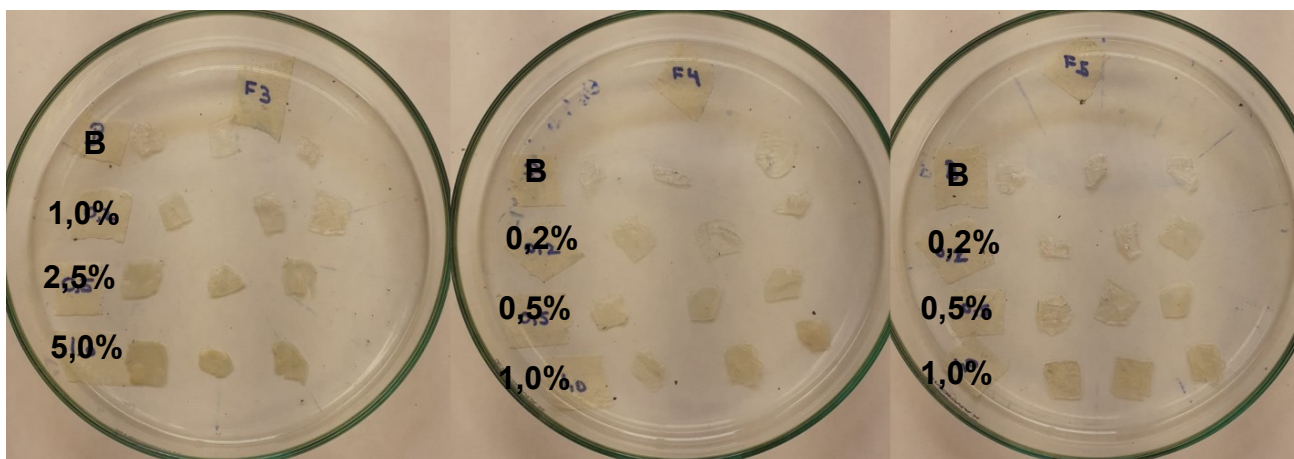


Fonte: elaborado pela própria autora (2023).

Como pode ser observado nas figuras, o grau de intumescimento dos filmes variou de 86,87% a 155,18%, sendo observado um maior intumescimento de acordo com o aumento da quantidade de ORA utilizada. Em relação ao grau de solubilidade das amostras, houve uma variação de 65,21% a 83,34%, uma tendência inversamente proporcional ao grau de intumescimento, onde os filmes com menor concentração de ORA apresentaram um grau de solubilidade maior. Além disso, é possível verificar no ensaio de intumescimento que as amostras retêm uma maior quantidade de fluido nas primeiras 8 horas de contato com o meio, tendo uma tendência a estabilizar a absorção até 24 h.

Em relação à integridade física dos recortes dos filmes, no ensaio de intumescimento não houve deformação, permanecendo os filmes íntegros até às 24 h testadas, como mostra a figura 21. Já no ensaio de solubilidade, após o tempo final de secagem, é possível reparar que os filmes com maior concentração de ORA se mantiveram mais íntegros em comparação com os de menor concentração, como mostra a figura 22, pois quanto maior a solubilidade, menor a integridade ao final do processo.

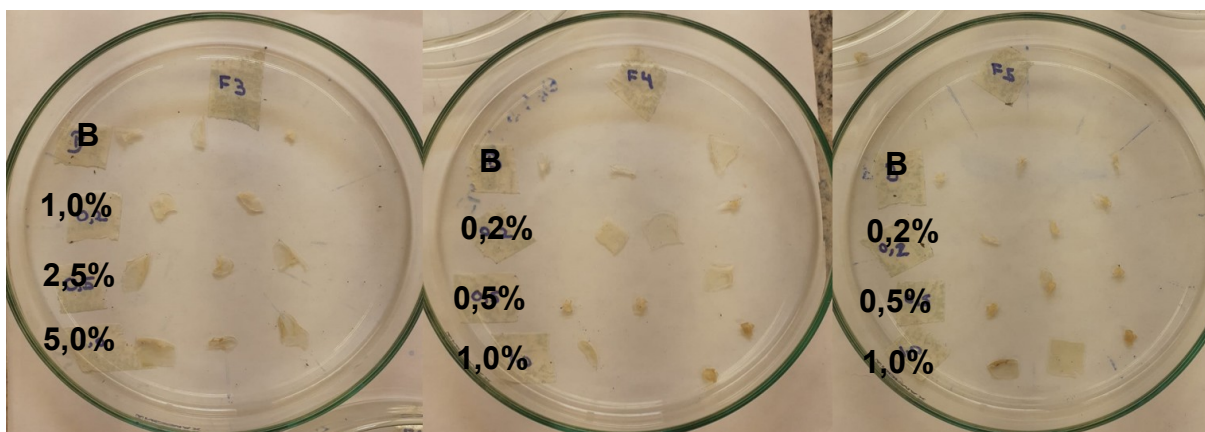
Figura 21: filmes após 24 h submersos em fluido simulador de feridas para o teste de intumescimento.



B: filme branco; 0,2%: filme com 0,2% de ORA; 0,5%: filme com 0,5% de ORA; 1,0%: filme com 1,0% de ORA; 2,5%: filme com 2,5% de ORA; 5,0%: filme com 5,0% de ORA.

Fonte: acervo pessoal (2023).

Figura 22: filmes após processo de secagem para o teste de solubilidade.



B: filme branco; 0,2%: filme com 0,2% de ORA; 0,5%: filme com 0,5% de ORA; 1,0%: filme com 1,0% de ORA; 2,5%: filme com 2,5% de ORA; 5,0%: filme com 5,0% de ORA.

Fonte: acervo pessoal (2023).

O grau de intumescimento de uma amostra está relacionado à presença de grupos hidrofílicos de constituintes de uma formulação, como é o caso da quitosana, da glicerina utilizada como plastificante e de substâncias hidrofílicas que podem estar presentes na ORA. Comportamento semelhante ao encontrado neste trabalho foi achado por Silva, A.C. (2022), no qual o intumescimento também aumentou de acordo com o aumento da concentração do ativo. Em relação aos valores

propriamente ditos, foram encontradas porcentagens próximas às apresentadas aqui no trabalho de Souza, V.G.L. *et al.* (2017), no qual os filmes que eram constituídos por quitosana e diferentes ativos naturais apresentaram grau de intumescimento variando de 70% a 200%.

Já o grau de solubilidade de uma amostra está mais associado à polaridade dos constituintes da formulação, o que poderia explicar a tendência encontrada neste trabalho de diminuir a solubilidade conforme o aumento de ORA, constituinte majoritariamente apolar. De fato, estudos como os de Brás, T. *et al.* (2020) mostram que o aumento da composição de substâncias apolares e hidrofóbicas diminuem a taxa de intumescimento e solubilidade. Resultados na literatura apontam que o grau de intumescimento e solubilidade são diretamente proporcionais (Silva, A.C., 2022), o que difere dos resultados encontrados aqui.

Diante do exposto, é possível concluir que os filmes formulados neste trabalho apresentam alta capacidade de intumescimento e manutenção de sua integridade por, pelo menos 24 h, o que pode indicar que esses filmes podem ser bioadesivos e que podem ajudar na retenção do excesso de exsudatos das lesões.

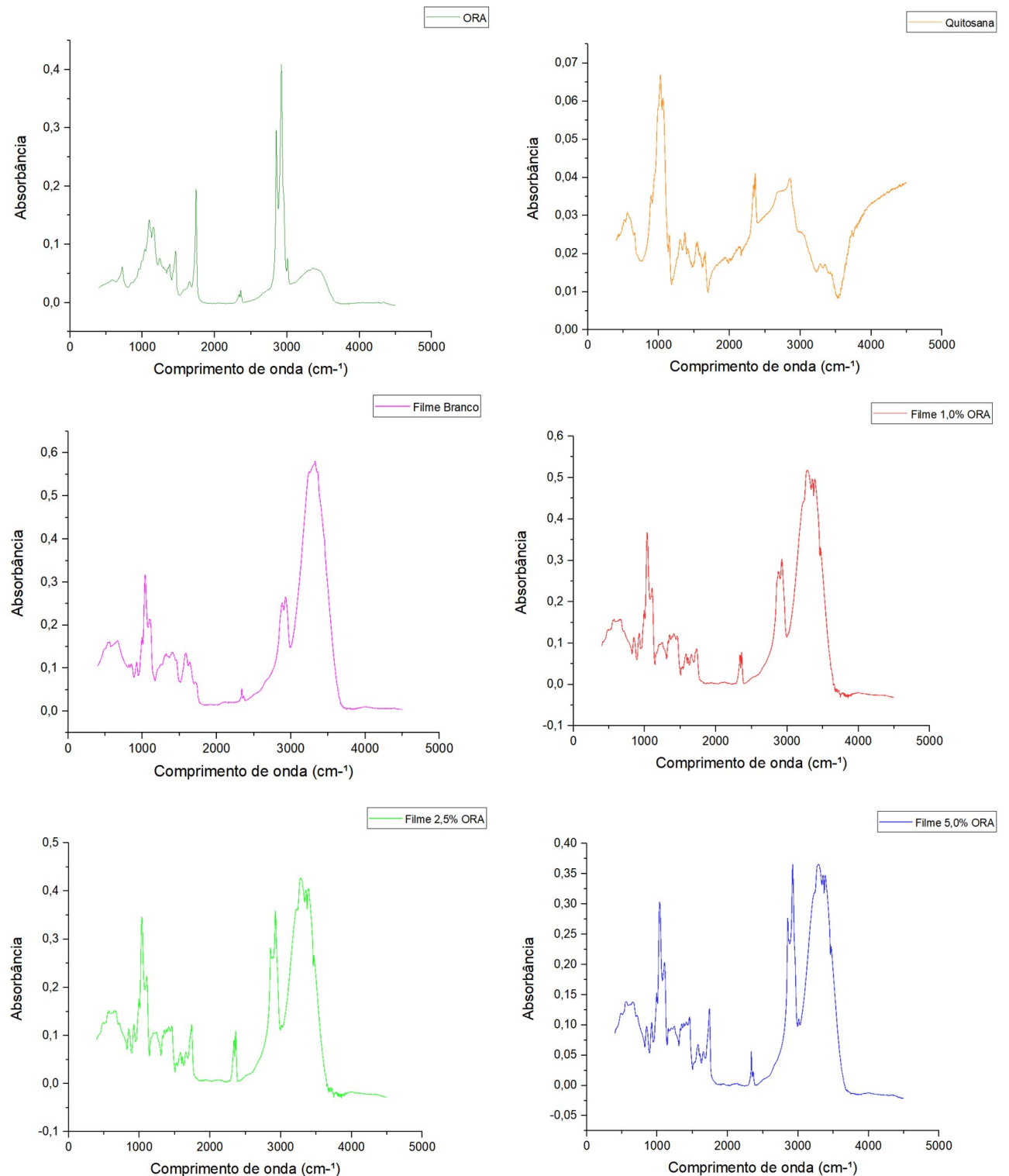
5.2.4 Caracterização físico-química por Espectroscopia eletrônica vibracional Raman e FT-IR

As análises por espectroscopia Raman e FT-IR constituem uma ferramenta para análise das interações moleculares entre os constituintes de uma formulação e para localização e determinação de grupos funcionais na amostra de acordo com a faixa de comprimento de onda estabelecida (Barbosa, L.C.A., 2011; Rodrigues, A.G.; Galzerani, J.C., 2012). As duas técnicas de espectroscopia identificam o modo vibracional típico das moléculas presentes na amostra.

A radiação na região do infravermelho interage com as moléculas ali presentes, levando-as a um estado vibracional, que é reflexo da absorção da radiação em frequências específicas de cada grupo funcional (Silva, A.C., 2022). Já na espectroscopia Raman, os espectros se dão pela fração da luz que é transmitida dentro de um material e retransmitida na forma de luz espalhada, cujo nome desse fenômeno é espalhamento Raman (Rodrigues, A.G.; Galzerani, J.C., 2012). As duas técnicas são complementares à medida que a detecção dos grupos funcionais varia de acordo com a técnica empregada. Os espectros de FT-IR obtidos a partir da F3

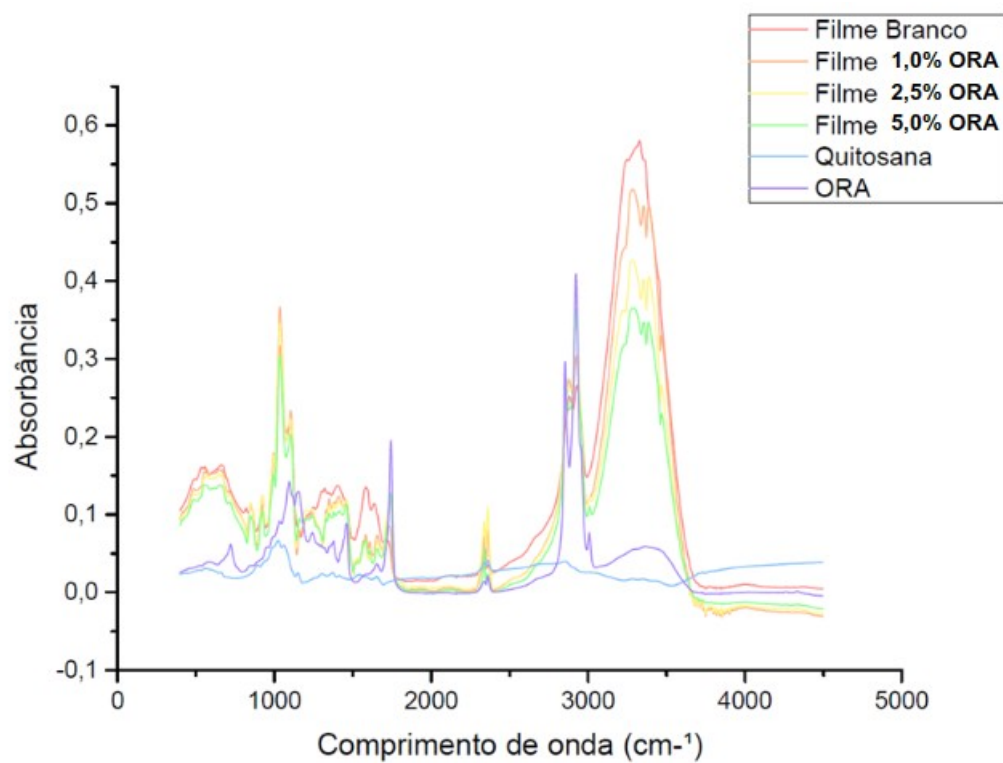
do presente estudo se encontram nas figuras 23 e 24, enquanto os espectros Raman nas figuras 25 e 26.

Figura 23: espectros do FT-IR dos filmes da F3 e seus constituintes ORA e quitosana.



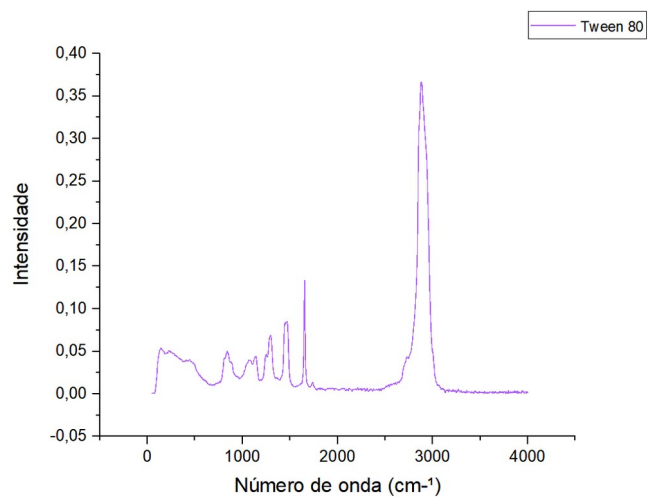
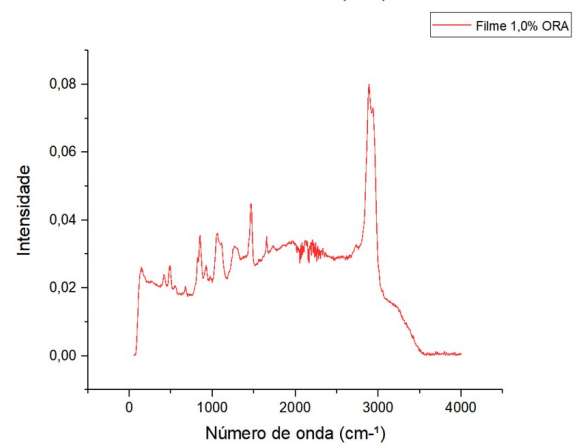
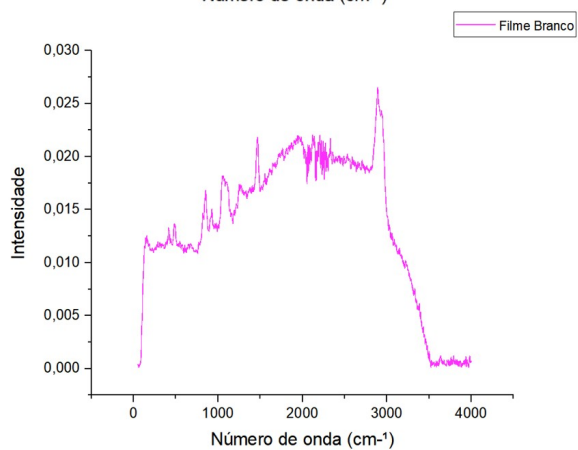
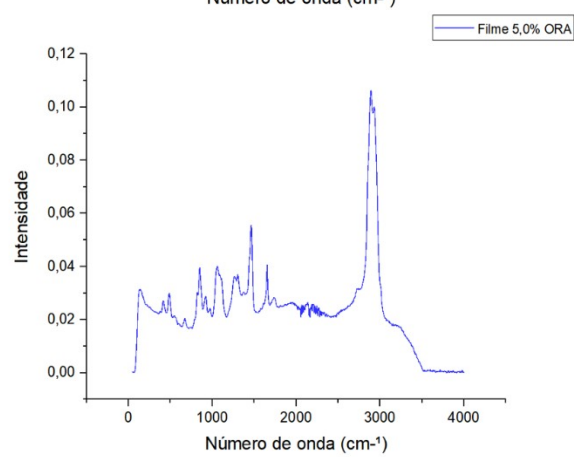
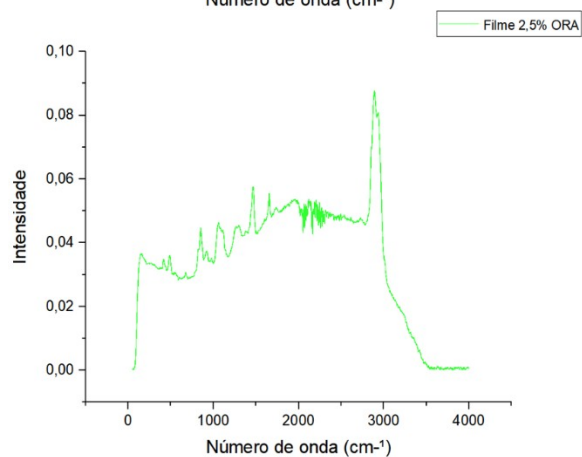
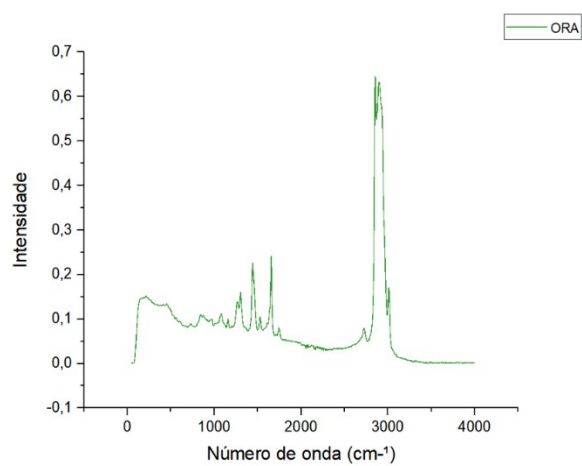
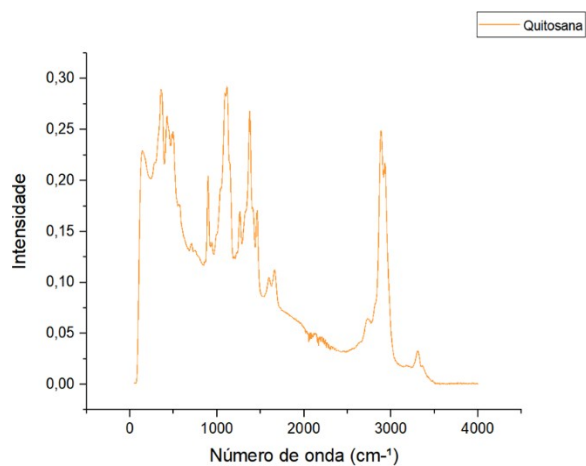
Fonte: elaborado pela própria autora (2023).

Figura 25: espectros de FT-IR dos filmes da F3 e seus constituintes ORA e quitosana sobrepostos.



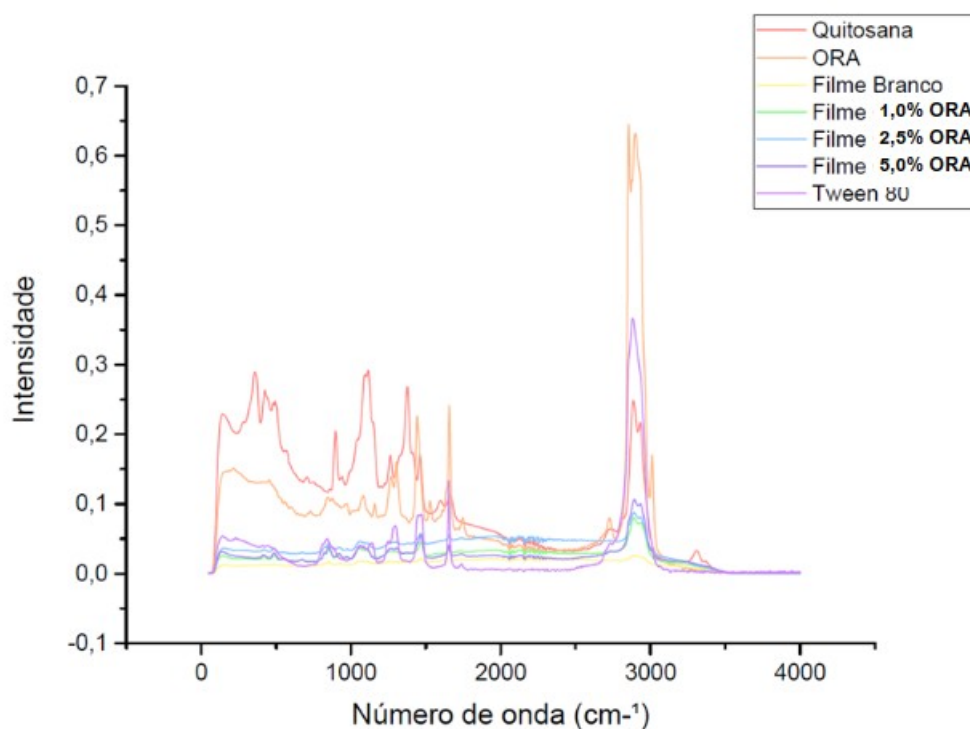
Fonte: elaborado pela própria autora (2023).

Figura 26: espectros RAMAN dos filmes da F3 e de seus constituintes ORA, quitosana e Tween 80.



Fonte: elaborado pela própria autora (2023).

Figura 27: espectros RAMAN dos filmes da F3 e seus constituintes ORA, quitosana e Tween 80 sobrepostos.



Fonte: elaborado pela própria autora (2023).

Como observado nas figuras anteriores, os espectros FT-IR dos filmes se mostraram semelhantes aos espectros obtidos dos seus constituintes puros ORA e quitosana, o que indica a provável interação molecular entre os grupos funcionais dos constituintes. Além disso, é possível verificar o deslocamento das bandas dos constituintes puros para comprimentos de ondas maiores nos filmes. Isso indica a interação polimérica e a incorporação dos compostos no filme, possivelmente devido a formação de novas ligações (Sousa, F.M.S., 2017). O aumento da absorção das bandas espectrais também varia nos diferentes filmes, já que a intensidade é proporcional à concentração dos compostos (Alves, A.C.S.B., 2018; Souza, A.M.; Poppi, R.J., 2012).

Em relação ao espectro do constituinte puro quitosana, pôde-se localizar bandas espectrais características dos grupos funcionais da quitosana. Entre elas, verifica-se uma banda com alta intensidade em torno de 1040 cm^{-1} que corresponde ao estiramento C-O presente em álcoois e fenóis. No comprimento de onda de 3000

a 3500 cm^{-1} é onde se encontra a região de estiramento O-H das ligações de hidrogênio, mas também indica a presença de N-H referente às aminas primárias e secundárias (Sousa, F.M.S., 2017; Silva, A.C., 2022).

A respeito do espectro da ORA, assim como no estudo de Alves, A.C.S.B. (2018) com OEA, foi detectado bandas na região de 3000 a 3250 cm^{-1} que correspondem ao estiramento O-H e C-H. A banda aparente da região de 1500 a 2500 cm^{-1} corresponde a grupos C=O e o pico na região até 1500 cm^{-1} pode se referir à grupos CH_2 e C-O de álcoois e fenóis, assim como no espectro da quitosana. Inferências sobre as bandas em regiões específicas nos dão a noção dos grupamentos funcionais presentes naquela amostra. No entanto, como a caracterização química da ORA não foi realizada, não é possível a associação direta do grupamento detectado e o nome da substância.

A espectroscopia Raman complementa as informações dadas pela FT-IR, principalmente na investigação de ligações de carbono em anéis alifáticos e aromáticos, nos momentos em que as ligações são difíceis de serem visualizadas pela FT-IR, como no caso de ligações C=C e N=N e quando as reações em meio aquoso são investigadas (Mettler Toledo, 2023). No que diz respeito aos espectros Raman obtidos neste estudo, também é possível verificar a interação entre os constituintes nos filmes quando comparados com os espectros dos constituintes puros, assim como na FT-IT. Nessa análise, porém, o Tween 80 (emulsificante da formulação proposta) também foi avaliado e é possível observar o seu espectro correspondente nos espectros dos filmes.

Tendo em vista o espectro da quitosana, é possível observar picos na região de 471 cm , que se referem ligações C-C-O, além de picos nas regiões de 969 a 1325 , que correspondem aos estiramentos de anéis. Picos na região próximo a 3000 cm indicam ligações C-H, visualizadas também por FT-IR. Esses resultados se assemelham com os Ren, X.D. *et al.* (2014) que utilizou Raman para caracterização de nanopartículas de quitosana.

Em relação ao espectro Raman obtido para a ORA, visualiza-se bandas intensas nas regiões de 653 e 1500 cm , que se referem aos compostos 1,8-cineol e cânfora pelas ligações C=O, característicos de extratos de alecrim. Esses resultados também foram encontrados nos estudos de Jentzsch, V.P.; Valerian, C. (2014). O último constituinte puro a ser analisado, o Tween 80 mostrou picos na região 1064 cm , referentes à ligações $-\text{CH}_3$, e picos até a região de 1652 cm , que são próprios

da substância, assim como relatado nos estudos de Mitsutake, M. *et al* (2018). Diante do exposto, pode-se considerar que os compostos tiveram uma interação molecular nas amostras de filmes, principalmente quando comparados o polímero quitosana e o ativo ORA.

5.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS FILMES

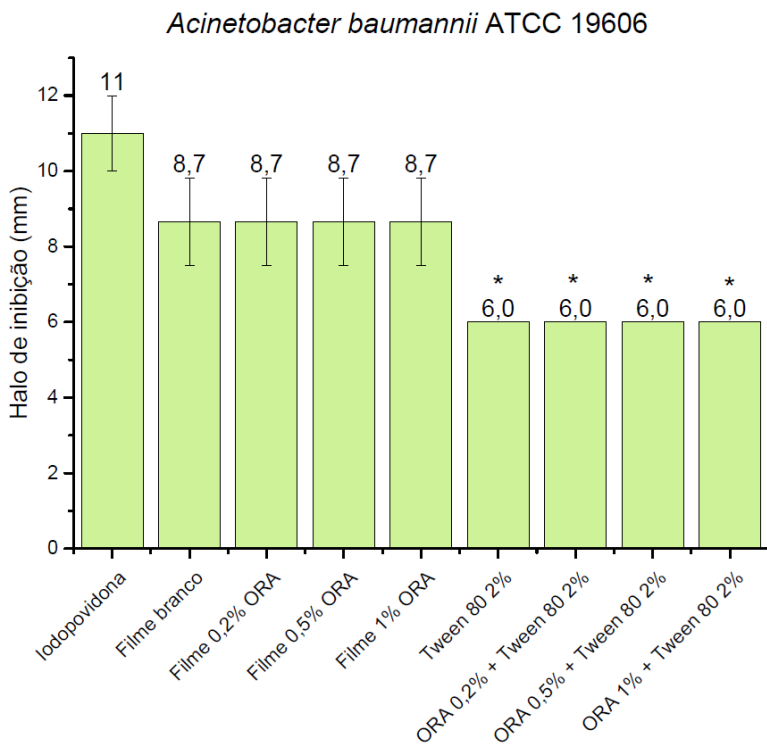
Estudos de determinação de atividade antimicrobiana frequentemente são realizados pelo método de difusão em ágar, que é considerado simples e de baixo custo. Nesse método ainda existem duas variações, que é a difusão em disco e a difusão por meio de poços. A primeira é a mais utilizada na literatura e é a principal escolha quando substâncias vegetais são testadas (Roquete, T. *et al.*, 2018). No entanto, o nível de sensibilidade desse teste não se assemelha à sensibilidade do teste de CIM por variados fatores que influenciam e podem atrapalhar a difusão do composto pelo ágar (Scorzoni, L. *et al.*, 2007), interferindo no halo de inibição e na interpretação dos resultados.

Nesse teste, três estirpes bacterianas que são muito frequentes e importantes no contexto das infecções secundárias nas queimaduras foram testadas e os resultados são mostrados nas figuras 27, 28 e 29. Nas figuras 27 e 28, são mostradas as comparações dos valores de halo de inibição para as bactérias Gram-negativas *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Em relação a *A. baumannii* pode ser verificado um halo de inibição maior para os filmes (8,7 mm) do que para os discos de papel com soluções de ORA (6 mm), indicando possível sinergismo entre a quitosana e o ativo ORA. Os valores encontrados não diferiram estatisticamente ($p < 5$) do tratamento controle com iodopolividona (11 mm). Para *P. aeruginosa*, os valores dos halos foram referentes aos valores dos discos, em torno de 6 mm, não mostrando atividade diferenciada para nenhuma das amostras testadas, inclusive para o controle iodopolividona a 10%. As diferentes concentrações de ORA nos filmes não foram suficientes para diferenciar o tamanho do halo de inibição entre elas, já que todos apresentaram o mesmo valor.

Estudos mostram resultados semelhantes de halo de inibição de OEA para *A. baumannii* com um valor de 8-8,5 mm de halo (Kwon, P.S.; Chang-Eun, P., 2018). Para *P. aeruginosa*, estudos de Ribeiro, E.; El-Tablawy, S.Y. (2016) mostraram um halo de inibição de 20 mm quando testado OEA. No entanto, além deles terem

utilizado uma menor quantidade de inóculo bacteriano (4×10^5 UFCs/mL) no teste, eles também adicionaram maior quantidade de OEA (20 μ L) e não o diluíram previamente, o que poderia aumentar a toxicidade do composto.

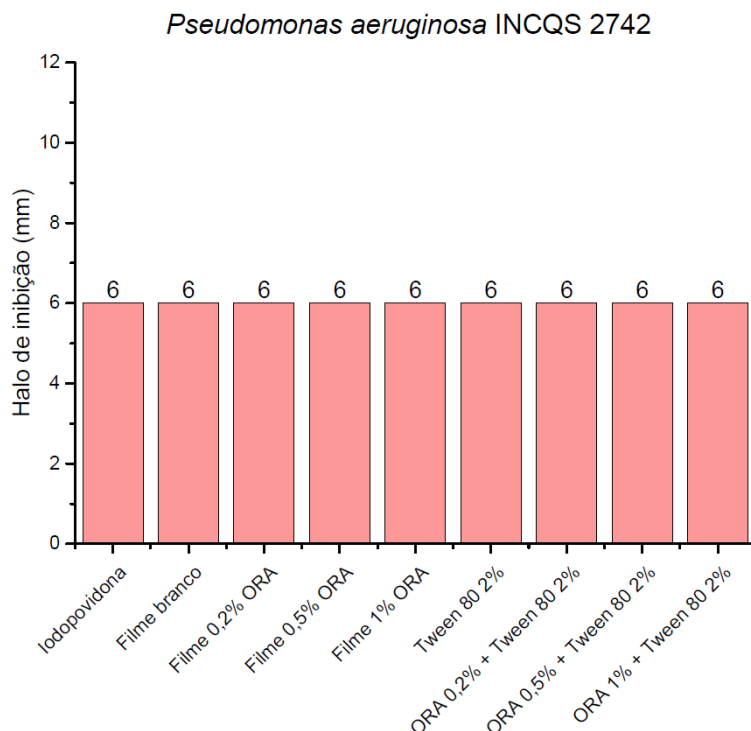
Figura 27: valores de halo de inibição dos filmes formulados e controles para *A. baumannii* ATCC 19606.



* Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle para um $p < 5$.

Fonte: elaborado pela própria autora (2023).

Figura 28: valores de halo de inibição dos filmes formulados e controles para *P. aeruginosa* INCQS 2742.

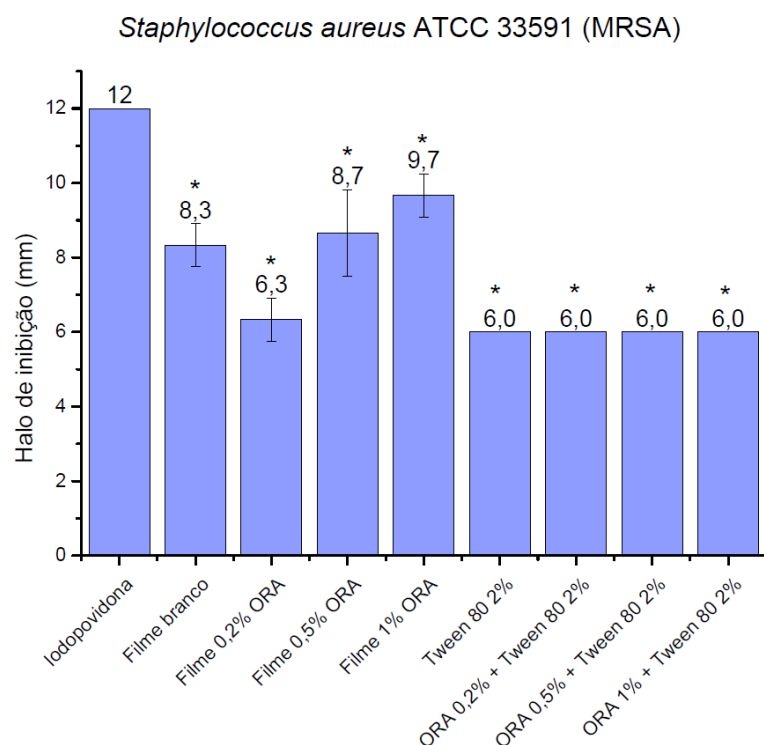


* Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle para um $p < 5$.

Fonte: elaborado pela própria autora (2023).

O teste de disco-difusão realizado neste trabalho também foi feito avaliando a susceptibilidade de uma amostra de *S. aureus* MRSA, considerando sua importância clínica em contextos hospitalares e em lesões infeccionadas a partir de queimaduras e os resultados se encontram na figura 30. Os resultados mostram halos de inibição variando de 6 mm para os discos de papel impregnados com soluções de ORA e Tween 80 até 9,7 mm para os discos dos filmes, aumentando o halo conforme o aumento da concentração de ORA. Para o controle iodopolividona, halos de 12 mm foram encontrados.

Figura 29: valores de halo de inibição dos filmes formulados e controles para *S. aureus* 33591 (MRSA).



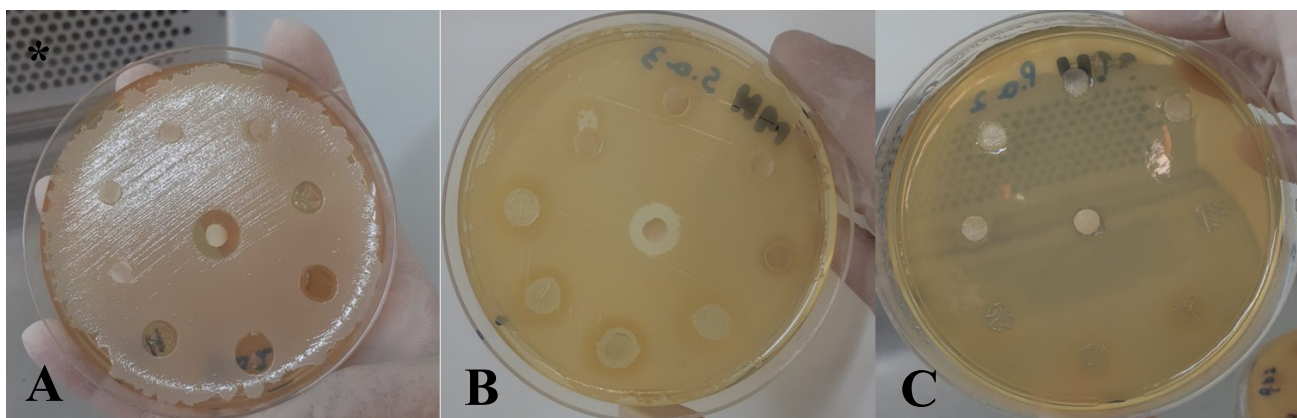
* Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle para um $p < 5$.

Fonte: elaborado pela própria autora (2023).

Issabeagloo, E. *et al.* (2012) em seus estudos testou o OEA em diferentes concentrações para a bactéria *S. aureus*, tendo como resultado um halo de 8,76 mm para uma solução de 10% de OEA, o que está consideravelmente acima da maior concentração utilizada neste trabalho, que é de 1,0%. Santos, P. *et al.* (2023) avaliou extratos aquosos e hidroalcóolicos de alecrim também impregnados em discos de papel. Os autores puderam perceber que não houve atividade significativa para os extratos aquosos, mas houve para os hidroalcóolicos indicando uma possível dificuldade de difusão do extrato aquoso para o ágar, impedindo sua atividade, ou devido a atividade antimicrobiana do álcool utilizado.

Observa-se pelos resultados a mesma tendência já relatada na literatura e na introdução do presente trabalho, a qual bactérias Gram-positivas se mostram mais suscetíveis do que as Gram-negativas (Cordeiro, C.H. *et al.*, 2006). As placas nas quais foram realizados os testes estão representadas na figura 30.

Figura 30: placas do ensaio de disco-difusão com a F5 e com as soluções de ORA.



A: placa com *A. baumannii* ATCC 19606; B: placa com *S. aureus* ATCC 33591 MRSA; C: placa com *P. aeruginosa* INCQS 2742. * O quadrante inferior das placas é onde se encontram os discos dos filmes, enquanto o superior é onde se encontra os papeis de filtro com soluções de ORA; o disco do meio se refere ao controle com iodopolividona.

Fonte: acervo pessoal (2023).

Diante dos resultados discutidos, é possível concluir que os filmes desenvolvidos neste trabalho à base de quitosana e ORA mostraram atividade antibacteriana frente a três das principais espécies bacterianas envolvidas nos processos infecciosos relacionados às queimaduras, indicando um possível sinergismo entre os constituintes e uma alternativa promissora para o controle das infecções secundárias nas queimaduras. A atividade eficaz dos filmes frente a *S. aureus* MRSA demonstradas neste trabalho é considerada relevante, pois a resistência bacteriana é um fator comum e importante, principalmente em ambientes hospitalares, os quais estão associados pacientes queimados. No mais, a busca por compostos naturais com atividades biológicas mostra-se promissora no contexto de cicatrização de controle de infecções nas feridas causadas por queimaduras.

6 CONCLUSÃO

Com base nos objetivos propostos para este trabalho, a atividade antimicrobiana de constituintes do filme foi avaliada e desenvolvimento de filmes à base de quitosana com diferentes concentrações de ORA foi realizado. A caracterização físico-química dos filmes foi avaliada com base em parâmetros de qualidade e por espectroscopia, além da confirmação da atividade antibacteriana dos mesmos, visando o controle de infecções secundárias em lesões por queimaduras.

No que tange a atividade antimicrobiana da ORA e dos filmes focando nas espécies envolvidas nas feridas, pode-se concluir que a ORA apresentou valores de CIM satisfatórios quando comparados aos resultados apresentados na literatura, principalmente para *S. aureus* sensível e multirresistente. Já os filmes mostraram sua atividade antibacteriana pelo teste de disco-difusão para bactérias Gram-positiva e Gram-negativas com halos maiores que quando testados somente a ORA e Tween 80, indicando um provável sinergismo entre a quitosana e a ORA.

Em relação ao desenvolvimento dos filmes e sua caracterização físico-química, eles apresentaram características uniformes e condizentes com os relatados na literatura. Os parâmetros de qualidade peso médio, espessura, umidade, intumescimento e solubilidade são semelhantes aos encontrados nos trabalhos de outros autores, com características favoráveis em um contexto de controle de infecção e reestruturação da pele lesionada. Os espectros Raman e FT-IR confirmaram interações moleculares dos constituintes das formulações por meio da comparação de seus espectros em relação aos constituintes puros.

Assim, o presente projeto traz novas opções para a abordagem no tratamento de infecções secundárias associadas às queimaduras com o desenvolvimento de uma nova formulação à base de componentes naturais e biodegradáveis. Os testes neste estudo foram feitos apenas *in vitro* e mais testes precisam ser realizados, como testes de atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e cicatrizantes. Assim, é interessante a continuação da caracterização das formulações apresentadas para posterior testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A. *et al.* Polymeric materials for chronic wound and burn dressings. **Advanced Wound Repair Therapies**, Woodhead Publishing, p. 186-208, 2011.

AKSUNGUR, P. *et al.* Chitosan delivery systems for the treatment of oral mucositis: In vitro and in vivo studies. **Journal of Controlled Release**, v. 98, n. 2, p. 269-279, 2004.

ALEMDAROGLU, C. *et al.* An investigation into the healing of burns in rats with a chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. **Burns**, v. 32, n. 3, p. 319-327, 2006.

ALVES, A.C.S.B. **Estudo sobre a influência do óleo de alecrim nas propriedades do poli3-hidroxibutirato/ polietilenoglicol**. Orientadora: Glória Maria Vinhas. 2018. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2018.

AMORIM, H.C.; VIANNA, L.V.; NOGUEIRA, V.B. **Avaliação de atividade antioxidante em nanoemulsão de óleo essencial de Alecrim**. 2022. 106 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2022.

ANDRADE, J.M. *et al.* **Rosmarinus officinalis L.: an update review of its phytochemistry and biological activity**. Future Science OA, v. 4, n. 4, 2018.

ARABY, E.; EL-TABLAHY, S.Y. Inhibitory effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil on pathogenicity of irradiated and non-irradiated *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 159, p. 24-32, 2016.

AZIZ, Z., ABDUL, R.H.B. The effects of honey compared to silver sulfadiazine for the treatment of burns: A systematic review of randomized controlled trials. **Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 43, n.1, p. 50-57, 2017.

AZZOPARDI, E.A. *et al.* Emerging gram negative infections in burns. **Journal of Burn Care & Research**, v. 32, n. 5, p. 570-576, 2011.

BARBOSA, L.C.A. Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de Compostos Orgânicos. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2011.

BEGUM, A. *et al.* An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 12, n. 1, p. 61-73, 2013.

BORGES, A.F. *et al.* Oral films: Current status and future perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 206, p. 1–19, 2015.

BRÁS, T. *et al.* Development of bioactive films based on chitosan and *Cynara cardunculus* leaves extracts for wound dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1707–17, 2020.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Boletim Epidemiológico, v. 53, n. 47, 2022.

Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences, v. 5, n. 5, p. 884-899, 2023.

BUNNEY, P. E. *et al.* Orexin activation counteracts decreases in nonexercise activity thermogenesis (NEAT) caused by high-fat diet. **Physiology & Behavior**, v. 176, p. 139–148, 2017.

CAI-LING, KE. *et al.* Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan. **Polymers (Basel)**, v. 13, n. 6, 2021.

CAMBIASO-DANIEL, J., *et al.* Treatment of infection in burn patients. **Total Burn Care**, v. 5, p. 93-113, 2018.

CARVALHO, F.G. *et al.* Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on *C. albicans* biofilm formation. **Materials Science & Engineering**, v. 104, 2019.

CATANZANO O.; BOATENG, J. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing – A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 11, p. 3653-3680, 2015.

CAZÓN, P. *et al.* Evaluation of easy-removing antioxidant films of chitosan with *Melaleuca alternifolia* essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 186, p. 365–376, 2021.

CHANDEL, V. *et al.* Current Advancements in Pectin: Extraction, Properties and Multifunctional Applications. **Foods**, v. 11, n. 17, 2022.

CHURCH, D. *et al.* Has an in-depth discussion of options for surveillance and prevention of infections, the different types of infections in burn patients, and treatment strategies. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 403-34, 2006.

CORDEIRO, C.H.G. *et al.* Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, 2006.

COSTA, E.M. *et al.* Chitosan as an effective inhibitor of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 347-351, 2017.

COSTA, N.N. *et al.* Polymeric films containing pomegranate peel extract based on PVA/starch/PAA blends for use as wound dressing: In vitro analysis and physicochemical evaluation. **Materials Science and Engineering**, v. 109, 2020.

DEVI, N.; DUTTA, J. Preparation and characterization of chitosan bentonite nanocomposite films for wound healing application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.104, p.1897–1904, 2017.

EDUARDO, L.S *et al.* Antibacterial Activity and Time-kill Kinetics of Positive Enantiomer of α -pinene Against Strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 917-924, 2018.

ESMAEL, A. *et al.* Antimicrobial activity of certain natural-based plant oils against the antibiotic-resistant acne bacteria. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 1, p. 448-455, 2020.

FAGHIHNEJAD, A.; ZENG, H. Hydrophobic interactions between polymer surfaces: Using polystyrene as a model system. **Soft Matter**, v. 8, 2012.

GALLAGHER, J.J. *et al.* Treatment of infection in burns. **Total Burn Care**, v. 4, p. 137-156, 2012.

GALVÃO, E. **Queimaduras**. MultiSaúde Educacional, 2020. Disponível em: <https://multisaude.com.br/artigos/queimaduras/>. Acesso em: 08/11/2023.

GENENA, A.K. *et al.* Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. **Food Science Technology**, v. 28, n. 2, p. 463-469, 2008.

GIBBONS, S., OLUWATUYI, M., KAATZ, G.W. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 51, p. 13-17, 2003.

GOMES, T.V., *et al.* Filmes Mucoadesivos na Saúde. *In: Ciência Médica – Descobertas Científicas para uma Saúde Transformadora*. São José dos Pinhais: Seven Publicações, 2023.

GOMEZ, R. *et al.* Causes of mortality by autopsy findings of combat casualties and civilian patients admitted to a burn unit. **Journal of American College of Surgeons**, v. 208, n. 3, p. 348-354, 2009.

GREENHALGH, D.G. Management of Burns. **The New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 24, p. 2349-2359, 2019.

HADWIGER, L.A. *et al.* Chitosan both activates genes in plants and inhibits RNA synthesis in Fungi. **Chitin in Nature and Technology**, 1986.

HE, M. *et al.* Recent advances of oral film as platform for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 604, 2021.

HEATH, H.B. *et al.* **Source Book of Flavours**. Westport, Connecticut: The AVI Publishing Company, 1981.

HYUN, H.B. *et al.* Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate fraction of *Rosmarinus officinalis* L. and its major components. *Journal of Applied Biological Biochemistry*, v. 58, p. 715-722, 2015.

INSTITUTE OF CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS (CLSI). **M-100**. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 32nd ed.; 2022.

INTERNATIONAL HERB ASSOCIATION. **Herb of the Year**. Disponível em: <<https://www.iherb.org/herb-of-the-year/>>. Acesso em: 30 de agosto de 2023.

ISSABEAGLOO, E. *et al.* Antimicrobial effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils against *Staphylococcus* spp. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 23, p. 5039-5042, 2012.

JADAV, M. *et al.* Advances in Xanthan Gum-Based Systems for the Delivery of Therapeutic Agents. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 402, 2023.

JAGADISH, C.R. *et al.* Surface behavior and bulk properties of aqueous chitosan and type-B gelatin solutions for effective emulsion formulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, p. 202-214, 2017.

JESCHKE, M.G. *et al.* Burn injury. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, 2020.

JIANG, Y. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 63-68, 2011.

JIANG, Y. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 63-68, 2011.

KARGOZAR, S. *et al.* Using Bioactive Glasses in Burn Management. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. 62, 2019.

KARPINSKI, T. *et al.* Anti-Candida and Antibiofilm Activity of Selected Lamiaceae Essential oils. **Frontiers in Bioscience**, v. 28, n. 2, 2023.

KENNEDY, J.F; KNILL. C.J.; THORLEY, M. Natural polymers for healing wounds. **Recent Advances in Environmentally Compatible Polymers**, p. 97- 104, 2001.

KOWALSKA-KROCHMAL, B.; DUDEK-WICHER, R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. **Pathogens**, v. 10, n. 2, 2021.

KWON, P.S.; CHANG-EUN, P. Antimicrobial Effects of Essential Oils for Multiresistant *Acinetobacter baumannii*. **The Korean Journal of Clinical Laboratory Science**, v. 50, p. 431-437, 2018.

LABIB, R.M. *et al.* Appraisal on the wound healing potential of *Melaleuca alternifolia* and *Rosmarinus officinalis* L. chitosan topical preparations loaded with essential oil. **Plos ONE**, v. 14, n. 9, 2019.

LADHANI, H.A.; YOUWLER, C.J.; CLARIDGE, J. A. Burn Wound Colonization, Infection, and Sepsis. **Surgical Infections**, v. 22, n. 1, p. 44-48, 2021.

LAM, S.; VELIKOV, K.; VELEV, O. Pickering Stabilization of Foams and Emulsions with Particles of Biological Origin. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 19, 2014.

LATANSKA, I. *et al.* The use of chitin and chitosan in manufacturing dressing materials. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives**, v. 25, p. 16-36, 2020.

LENSKI, R.E. *et al.* Evolution of competitive fitness in experimental populations of *E. coli*: what makes one genotype a better competitor than another? **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 1, p. 35-47, 1998.

LUQMAN, S. *et al.* Potential of Rosemary oil to be used in drug-resistant infections. **Alternative Therapies**, v. 13, n. 5, p. 54-59, 2007.

MACEDO, L.M. *et al.* Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *Salvia Rosmarinus* Spenn.) and Its Topical Applications: A Review. **Plants**, v.9, n. 651, 2020.

MARKIEWICZ-GOSPODAREK, A. Burn Wound Healing: Clinical Complications, Medical Care, Treatment, and Dressing Types: The Current State of Knowledge for Clinical Practice. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 3, 2022.

MAY, J. *et al.* French Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 639-643, 2000.

MCLURE, M. *et al.* A Rapid Review of Burns First Aid Guidelines: Is There Consistency Across International Guidelines? **Cureus**, v. 13, n. 6, 2021.

MENA, P. *et al.* Phytochemical Profiling of Flavonoids, Phenolic Acids, Terpenoids, and Volatile Fraction of a Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract. **Molecules**, v. 21, n. 11, 2016.

METTLER TOLEDO. **Espectroscopia Raman**: Amplie o seu Conhecimento sobre Reações Químicas. Disponível em: <https://www.mt.com/br/pt/home/applications/L1_AutoChem_Applications/Raman-Spectroscopy.html>. Acesso em: 03 de dezembro de 2023.

MITSUTAKE, H. *et al.* Comparison of different chemometric methods to extract chemical and physical information from Raman images of homogeneous and heterogeneous semi-solid pharmaceutical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 552, n. 1-2, p. 119–129, 2018.

MONCRIEF, J.A. The status of topical antibacterial therapy in the treatment of burns. **Surgery**, v. 63, p. 862-867, 1968.

MONTERREY, E.S.; SOBRAL, P. J. A. Characterization of mechanical and optical properties of tilapia myofibrillar proteins-based biofilms using a surface-response method. **Food Science and Technology**, v. 19, n. 2, 1999.

MORAIS, D.C.M. *et al.* Ação cicatrizante de substâncias ativas: d-pantenol, óleo de girassol, papaína, própolis e fator de crescimento de fibroblastos. **Revista Foco**, v. 4, n. 4, p. 83-97, 2013.

MULLER, L. *et al.* Determination of Mucoadhesion of Polyvinyl Alcohol Films to Human Intestinal Tissue. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 6, 2023.

NIETO, G. Biological Activities of Three Essential Oils of the Lamiaceae Family. **Medicines**, v. 4, n. 63, 2017.

NIVETHA, G. *et al.* Antibacterial activity of rosemary oleoresin against *Enterococcus faecalis* – An in vitro study. **Drug Invention Today**, v. 11, n. 5, p. 1201-1203, 2019.

OJEDA-SANA, A.M. *et al.* New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. **Food Control**, v. 31, p. 189–195, 2013.

OLIVAS-MÉNDEZ, P. *et al.* Antioxidant and Antimicrobial Activity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and Garlic (*Allium sativum*) Essential Oils and Chipotle Pepper Oleoresin (*Capsicum annum*) on Beef Hamburgers. **Foods**, v. 11, n. 14, 2022.

OLIVEIRA, J.R. *et al.* Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 242, n. 6, p. 625-634, 2017.

PALMIERI, T.L. Prevenção de Infecções: aspectos únicos das unidades de queimados. **Surgical Infections**, v. 20, p. 111-114, 2019.

PANSARA, C. *et al.* Formulation of chitosan stabilized silver nanoparticle-containing wound healing film: In-vitro and in-vivo characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, n. 7, p. 2196-2205, 2020.

PARVIZI, A. *et al.* A systematic review of life satisfaction and related factors among burns patients. **International Wound Journal**, v. 20, n. 7, p. 2830-2842, 2023.

- PATEL, R. *et al.* Burn assessment: A critical review on care, advances in burn healing and pre-clinical animal studies. **Journal of Research in Pharmacy**, v. 27, n. 4, p. 1577- 1593, 2023.
- PATRULEA, V. *et al.* Chitosan as a starting material for wound healing applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, Pt B, p. 417-426, 2015.
- PAUL, P.; KOLESIŃSKA, B.; SUJKA, W. Chitosan and its derivatives - Biomaterials with diverse Biological Activity for Manifold Applications. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 737-750, 2019.
- PAUL, W.; SHARMA, C.P. Chitosan, a drug carrier for the 21st century: a review. **STP Pharma Sciences**, v. 10, n. 1, p. 5-22, 2000.
- PEREIRA, G.G. *et al.* Polymeric films loaded with vitamin E and *Aloe vera* for topical application in the treatment of burn wounds. **Biomed Research International**, 2014.
- PINTORE, G.A.M. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 15-19, 2002.
- POTOKAR, T. *et al.* A comprehensive, integrated approach to quality improvement and capacity building in burn care and prevention in low and middle-income countries: An overview. **Burns**, v. 46, n. 8, p. 1756-67, 2020.
- POURDARVISH, R.; DANNER, R.P.; DUDA, J.L. Mechanism of bubble formation in the drying of polymer films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 111, n. 1, p. 417-428, 2008.
- RAAFAT, D. *et al.* Insights into chitosan's mode of action as an antibacterial compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3764–3773, 2008.
- RABEA, E.I. *et al.* Chitosan as an antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.
- RANJBAR, R.; YOUSEFI, A. Effects of Aloe Vera and Chitosan Nanoparticle Thin-Film Membranes on Wound Healing in Full Thickness Infected Wounds with Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **Bulletin of Emergency and Trauma**, v. 6, n. 1, p. 8-15, 2018.
- REN, X.D. *et al.* The Characterization of Chitosan Nanoparticles by Raman Spectroscopy. **Applied Mechanics and Materials**, v. 665, p. 367–370, 2014.
- RIBEIRO-SANTOS, R. *et al.* A novel insight on an ancient aromatic plant: The Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 355–368, 2015.

ROBSON, M.C. Bacterial control in the burn wound. **Clinics in Plast Surgery**, v. 6, p. 515-521, 1979.

RODRIGUES, A.G.; GALZERANI, J.C. Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 5, 2012.

ROQUETE, T. *et al.* Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Infarma – Ciências Farmacêuticas**, v. 30, n. 50, 2018.

SANTOS, C.C. **Desenvolvimento de filmes poliméricos com MgB4O7:Ce,Li para aplicações dosimétricas**. Orientadora: Suzana Oliveira de Souza. 2018. Dissertação (Mestrado), 98 f. Pós-Graduação em Física. Universidade Federal de Sergipe. 2018.

SANTOS, P. *et al.* Análise fitoquímica e avaliação in vitro da ação antimicrobiana do extrato fluido de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e amélia (*Hamelia patens* Jacq.). **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 5, n. 5, p. 884-899, 2023.

SCORZONI, L. *et al.* Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* spp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.1, p. 25-34, 2007.

SHAH, A. *et al.* The wound healing and antibacterial potential of triple-component nanocomposite (chitosan-silver-sericin) films loaded with moxifloxacin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 564, p. 22–38, 2019.

SHI, C. *et al.* Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. **Journal of Surgical Research**, v. 133, n. 2, p. 185-192, 2006.

SILVA, A.C. **Incorporação de extrato de folhas de café (*Coffea arabica* L.) em filmes de quitosana: caracterização físico-química e avaliação das atividades antimicrobiana e cicatrizante *in vitro***. Orientador: Ângelo Márcio Leite Denadai. 2022. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Juiz de Fora. 2022.

SIMÕES, M.; BENNETT, R.N.; ROSA, E.A.S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 6, 2009.

SOBHANI, Z. *et al.* Nanoparticles of chitosan loaded ciprofloxacin: Fabrication and Antimicrobial Activity. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 3, p. 427–432, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUEIMADURAS (SBQ). **Primeiro boletim epidemiológico que abrange queimaduras é publicado**. 2023. Disponível em:

<<https://sbqueimaduras.org.br/noticia/primeiro-boletim-epidemiologico-que-abrange-queimaduras-e-publicado>>. Acesso em: 30 de agosto de 2023.

SOMAS, KT; ANITHA, R; LAKSHMI, D. Green synthesis of silver nanoparticles mediated by rosemary oleoresin and its effect on oral pathogens. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 12, 2019.

SOUSA, F.M.S. **Preparo e caracterização de membranas de quitosana com extratos foliares de *Combretum duarceanum cambess* para aplicações biológicas**. Orientadora: Marina de Oliveira Cardoso Macêdo. 2017. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais. Universidade Federal do Piauí. 2017.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte 1. **Química Nova**, v. 35, p. 223-229, 2012.

SOUZA, V.G.L. *et al.* Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 565-572, 2017.

SPENCER, A.L.R.; SPENCER, J.F.T. **Public health microbiology**: methods and protocols, 1st ed., New Jersey: Human Press Inc., 568 p, 2004.

STOJILJKOVIC, J. *et al.* Antibacterial activities of rosemary essential oils and their components against pathogenic bacteria. *Advances in Cytology & Pathology*, v. 3, n. 4, p. 93–96, 2018.

STRAWHECKER, K.E.; KUMAR, S.K. The Critical Role of Solvent Evaporation on the Roughness of Spin-Cast Polymer Films. **Macromolecules**, v. 34, p. 4669-4672, 2001.

SUNASEE, R.; HEMRAZ, U. D.; CKLESS, K. Cellulose nanocrystals: a versatile nanoplatform for emerging biomedical applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 9, p. 1243–1256, 2016.

TADROS, T.F. *Emulsions: Formation, Stability, Industrial Applications in: Emulsions*. Germany: De Gruyter, 2016.

TAM, V.H.; SCHILLING, A.N.; NIKOLAOU, M. Modelling time–kill studies to discern the pharmacodynamics of meropenem. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 699-706, 2005.

TAYEL, A.A. *et al.* Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 4, p. 454-457, 2010.

TEJIRAM, S.; SHUPP, J.W. Infections in Burn Patients: Innovations in Infection Prevention and Treatment. **Surgical Infections**, v. 21, 2020.

TORRES, M.J.M.; PETERSON, J.M.; WOLF, S.E. Detection of Infection and Sepsis in Burns. **Surgical Infections** (Larchmt), v. 22, n. 1, p. 20-27, 2021.

TUREK, C.; STINTZING, F.C. Essential oils stability: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, 2013.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiology Reviews**, v. 56, n. 3, p. 395-411, 1992.

VINAİK, R. *et al.* Management and prevention of drug-resistant infections in burn patients. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 17, n. 8, p. 607-619, 2019.

WOOLLARD, A.C.; TATHAM, K.C.; BARKER, S.A. The influence of essential oils on the process of wound healing: a review of the current evidence. **Journal of Wound Care**, v. 16, n. 6, p. 255-257, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Queimaduras**. Genebra: WHO, 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>>. Acesso em: 30 de agosto de 2023.

YAKIMETS, I. *et al.* Effect of Water Content on the Structural Reorganization and Elastic Properties of Biopolymer Films: A Comparative Study. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 5, p. 1710–1722, 2007.

YASAYAN, G. *et al.* Natural polymers for wound dressing applications. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 74, p. 367-441, 2022.

ZHILONG, Q. *et al.* Synthesis and antimicrobial activities of chitosan/polypropylene carbonate-based nanoparticles. **RSC Advances**, v. 11, n. 17, p. 10121-10129, 2021.

ZHOU, J. *et al.* Candidemia in patients with severe burns and their possible risk factors: A 6-year retrospective study in a burns ICU. **Burns**, v. 45, n. 5, p. 1164-71, 2019.

Anexo I



ÓLEO RESINA DE ALECRIM

Nome Botânico: Rosmarinus officinalis L. (Rosemary) – **Origem:** Índia
Preparação: Extração por solvente das partes aéreas secas de erva.
Lote: YA220901 - **Validade:** 12/2023 - **Fabricação:** 28/06/2022

Características	Especificações	Resultado
Aparência	Líquido Viscoso	De Acordo
Cor	Amarelo Amarronzado	De Acordo
Odor	Leve odor de alecrim	De Acordo
Solubilidade	Solúvel em Óleo e Dispersível em água.	De acordo
Ácido Carnósico (%)	--	8,10

IMPORTANTE

- Uso Cosmético.
- Armazenar em local fresco e arejado ao abrigo da luz, a temperatura constante, preferencialmente ambiente.
- Manuseio: Evitar o contato com a pele e os olhos.
- A Engenharia das Essências não se responsabiliza pela aplicação e conservação inadequada do produto, todas as etapas do processo, são de inteira responsabilidade do manipulador, atente-se as dosagens recomendadas.
- Laudo transcrito do original e emitido eletronicamente, não necessita de assinatura.

Responsável técnico:
CRQ04367032