

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

JULIANA ABREU MELO

**PRODUÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS À BASE DE COLÁGENO EM PÓ
INCORPORADOS COM EXTRATO LIOFILIZADO DE *Platonia insignis* Mart.
(BACURI) PARA USO EM FERIDAS.**

São Luís
2018

JULIANA ABREU MELO

**PRODUÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS À BASE DE COLÁGENO EM PÓ
INCORPORADOS COM EXTRATO LIOFILIZADO DE *Platonia insignis* Mart.
(BACURI) PARA USO EM FERIDAS.**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção de Título de Bacharel em Farmácia.

Prof^a. Dr^a. Patrícia de Maria Silva Figueiredo

São Luís

2018

JULIANA ABREU MELO

**PRODUÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS À BASE DE COLÁGENO EM PÓ
INCORPORADOS COM EXTRATO LIOFILIZADO DE *Platonia insignis* Mart.
(BACURI) PARA USO EM FERIDAS.**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Maranhão como requisito
para obtenção de Título de Bacharel em Farmácia.

Prof^a. Dr^a. Patrícia de Maria Silva Figueiredo

Aprovado em: _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Patricia de Maria Silva Figueiredo - UFMA

Prof.^a M.^a Elizabeth Regina de Castro Borba – UFMA

Prof.^a Dr^a Luiza Helena Araújo do Carmo - UFMA

São Luís

2018

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder todas as oportunidades necessárias para que eu chegasse até aqui, pela proteção, bênçãos e força diária.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram e estiveram comigo em todos os momentos, em especial, aos meus avós maternos (in memoriam) e minha Mãe por me darem todo suporte, apoio, amor, isso é para vocês e por vocês.

As minhas irmãs, Mariana e Karol, por acreditarem que eu conseguiria, até mais que eu. Agradecer aos meus sobrinhos, João Vinícius e Isabela, e aos meus afilhados que são as alegrias dos meus dias.

Ao meu namorado, Rafael, por ser meu ombro amigo, obrigada por me apoiar e me dizer que tudo ia melhorar, sem você isso não teria o mesmo sentido.

À minha orientadora, Prof.^a Dr^a Patrícia de Maria Silva Figueiredo, por acreditar e me mostrar que na pesquisa a palavra desistir é substituída por persistir. À senhora, o meu muito obrigado por me deixar embarcar na sua tripulação.

Não poderia deixar de agradecer à todos os amigos que fiz durante o curso, especialmente, Rafaela, Thalita e Ramylia, que estão comigo desde o primeiro período e que me ajudaram na concretização desse momento. Agradecer, também, aos amigos que me acolheram e fizeram meus dias mais leves, obrigada, Rosymari, Wellaine, Isaias, Luzimar, Laura, Jacqueline, Carla, Ana Paula, Tassiano, Deane.

Agradecer à todos os membros do Laboratório de Microbiologia Clínica, em especial, a Emmeline, Ribamar e Margareth por me recepcionarem tão bem e por repassarem com carinho um pouco dos seus conhecimentos, também agradecer, aos mestrandos, Thiago, Andressa e Larissa, e as minhas amigas não só de Laboratório, mas da vida, Ana Clara, Raissa, Yasmin.

À empresa NOVAPROM FOOD INGREDIENTS Ltda. que forneceu a matéria-prima para o desenvolvimento dos filmes.

À todos vocês a minha Gratidão!

“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se transformam em golpes fatais. Mas, se você tiver grandes sonhos... Seus sonhos produzirão crescimento, Seus desafios produzirão oportunidades, Seus medos produzirão coragem”.

Autor: Augusto Cury

RESUMO

Os biomateriais criados a partir do colágeno representam uma alternativa terapêutica com aplicação variada na área médica e odontológica, já que apresenta grande biocompatibilidade e capacidade de promover a cura de feridas. Este trabalho visa o desenvolvimento de filmes biodegradável à base de Colágeno para uso em feridas incorporados com extratos de *Platonia insignis* Mart. Para preparação dos filmes seguiu-se o sistema de casting. Os testes de caracterização dos filmes também foram realizados, como testes de solubilidade em água, permeabilidade ao vapor d'água, intumescimento, gramatura e análise macroscópica. A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato das folhas, foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo e para avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes, utilizou-se o teste de difusão em discos com aproximadamente 13 mm de diâmetro frente a cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 90028. O controle de qualidade Microbiológico foi realizado para averiguar se a manipulação do bioproduto e do filme biodegradável seguiram as Boas Práticas de Manipulação de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5^o edição de 2010. Os testes de caracterização apresentaram resultados satisfatórios, o filme apresentou-se homogêneo, contínuo e manuseável, além de ser insolúvel em água e com capacidade de absorção de água quando em contato com ambiente úmido. Com o resultado do teste de atividade antimicrobiana da microdiluição do extrato bruto apresentou CIM entre 3,12 mg/mL e 6.25 mg/mL. E para o teste de difusão em ágar dos filmes incorporados obteve-se halos de inibição entre 16,5mm e 20mm. Dessa forma, pode-se afirmar que o filme de colágeno é eficaz como base para incorporação de extratos, pois não dificulta a sua difusão no meio. De acordo com os resultados dos testes de Controle de Qualidade do extrato liofilizado de *Platonia insignis* e do filme de colágeno em pó incorporado com o extrato de *Platonia insignis*, houve a ausência de microrganismos demonstrando assim a correta manipulação dos bioprodutos, extrato e filme incorporado com o extrato. De acordo com os resultados foi possível perceber que os filmes de colágeno apresentaram características satisfatórias para a finalidade proposta, por evidenciar uma atividade antimicrobiana, controle de qualidade dentro dos padrões farmacopeicos e características viáveis para sua aplicação.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana; Filme biodegradável; Extrato vegetal; Colágeno em pó.

ABSTRACT

The biomaterials created from collagen represent a therapeutic alternative with varied application in the medical and dental areas, since it presents great biocompatibility and ability to promote wound healing. This work aims at the development of biodegradable films based on Collagen for use in wounds incorporated with extracts from *Platonia insignis* Mart. For the preparation of the films followed the casting system. The characterization tests of the films were also performed, such as water solubility tests, water vapor permeability, swelling, grammage and macroscopic analysis. The evaluation of the antimicrobial activity of the leaf extract was performed by broth microdilution technique and to evaluate the antimicrobial activity of the films, the diffusion test was used in disks with approximately 13 mm of diameter against strains of *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *Candida albicans* ATCC 90028. Microbiological quality control was performed to ascertain whether manipulation of the bioproduct and the biodegradable film followed the Good Handling Practices according to the Brazilian Pharmacopoeia Fifth edition of 2010. The characterization tests presented satisfactory results, the film was homogeneous, continuous and handy, besides being insoluble in water and with water absorption capacity when in contact with humid environment. With the result of the antimicrobial activity test of the microdilution of the crude extract presented MIC between 3.12 mg / mL and 6.25 mg / mL. And for the agar diffusion test of the incorporated films, inhibition halos between 16.5 mm and 20 mm were obtained. Thus, it can be stated that the collagen film is effective as a base for the incorporation of extracts, as it does not hinder its diffusion in the medium. According to the results of the Quality Control tests of the *Platonia insignis* lyophilized extract and the collagen powder film incorporated with *Platonia insignis* extract, there was a lack of microorganisms demonstrating the correct handling of bioproducts, extract and embedded film with the extract. According to the results, it was possible to observe that the collagen films presented satisfactory characteristics for the proposed purpose, as evidencing an antimicrobial activity, quality control within pharmacopoeial standards and feasible characteristics for its application.

Key-words: Antimicrobial activity; Biodegradable film; Vegetable extract; Collagen powder.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processos para elaboração dos Filmes

Figura 2: Filme Base de Colágeno em pó adicionado de Glicerol e Ácido acético glacial (a), Filme de Colágeno com propilenoglicol sem adição de ácido acético glacial (b), Filme de Colágeno com propilenoglicol e ácido acético glacial (c).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre os filmes quanto a presença de ácido e ao tipo de plastificante

Tabela 2: Análise subjetiva dos filmes

Tabela 3: Resultado do teste de CAA em função do tempo

Tabela 4: Valores expressos de peso ganho da célula, em gramas, e permeabilidade aos vapores de água (P_{Va}), em g.mm/m².dia.mmHg⁻¹ do filme base.

Tabela 5: Atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroetanólico (a 70%) a partir das folhas de *Platonia insignis* Mart. (Bacuri)

Tabela 6: Classificação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais.

Tabela 7: Halos de inibição formados pela presença de filmes biodegradáveis incorporados com extrato de *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) frente microrganismos de interesse clínico pelo método de difusão em ágar.

Tabela 8: Critério de avaliação da atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em ágar

Tabela 9: Avaliação do controle de qualidade microbiológico do Filme Biodegradável incorporado com o extrato de *Platonia insignis* Mart.

Tabela 10: Limite Microbiano para produtos não estéreis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHI - *Brain Heart Infusion*

CAA - Capacidade de absorção de água

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

PVA – Permeabilidade ao vapor d'água

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFMA- Universidade Federal do Maranhão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	DA ESPÉCIE VEGETAL	15
2.2	BIOFILMES	16
2.3	COLÁGENO	16
2.4	CURATIVOS	17
2.5	PROPRIEDADES DOS FILMES BIODEGRADÁVEIS	18
2.5.1	Solubilidade	18
2.5.2	Teste de Intumescimento	19
2.5.3	Permeabilidade ao vapor d'água	19
2.6	CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO	20
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVO GERAL	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	METODOLOGIA DA PESQUISA	22
4.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE MATERIAL BOTÂNICO	22
4.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO	22
4.3	PRODUÇÃO DO FILME BIODEGRADÁVEL E INCORPORAÇÃO DO EXTRATO	22
4.4	CARACTERIZAÇÃO DO FILME BIODEGRADÁVEL	23
4.4.1	Análise Macroscópica	23
4.4.2	Solubilidade	24
4.4.3	Gramatura	24
4.4.4	Teste de Intumescimento	25
4.4.5	Permeabilidade ao vapor d'água	25
4.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DOS FILMES INCORPORADOS COM EXTRATOS LIOFILIZADO DE <i>Platonia insignis</i> MART	26
4.5.1	Seleção de Microrganismos	26
4.5.2	Preparo de suspensões bacterianas	26
4.5.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima do Extrato Bruto	26
4.5.4	Determinação da Concentração Bactericida Mínima do Extrato Bruto	27

4.5.5	Teste de Difusão em ágar do Biofilme incorporado com Extrato liofilizado de <i>Platonia insignis</i> Mart	27
4.6	CONTROLE DE QUALIDADE	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1	RENDIMENTO DO EXTRATO	29
5.2	PRODUÇÃO DOS BIOFILMES E INCORPORAÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO DE <i>Platonia insignia</i> MART	29
5.3	TESTES DE CARACTERIZAÇÃO	30
5.3.1	Análise macroscópica.....	30
5.3.2	Solubilidade.....	32
5.3.3	Gramatura	32
5.3.4	Teste de Intumescimento	33
5.3.4	Permeabilidade ao vapor d'água	33
5.4	TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	35
5.4.1	Atividade antimicrobiana do extrato liofilizado das folhas de <i>Platonia insignis</i> Mart. (Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima - CIM e CBM	35
5.4.2	Atividade Antimicrobiana do Filme Biodegradável Incorporado com Extrato liofilizado de <i>Platonia insignis</i> Mart	36
5.5	CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO	39
6	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais, particularmente da flora, com fins medicinais, nasceu com a humanidade. Indícios do uso de plantas medicinais e tóxicas foram encontrados nas civilizações mais antigas, sendo considerada uma das práticas mais remotas utilizadas pelo homem para cura, prevenção e tratamento de doenças, servindo como importante fonte de compostos biologicamente ativos (FIRMO,2012).

Nos países em desenvolvimento as doenças estão relacionadas com a falta de saneamento básico, desnutrição e dificuldade de acesso aos medicamentos. Neste contexto e decorrente do uso etnomedicinal, a fitoterapia é amplamente praticada (MICHELIN,2005).

Com a evolução da química moderna e desenvolvimento industrial, os princípios ativos de muitas plantas com características terapêuticas, puderam ser delas extraídos, isolados e refinados, sendo posteriormente até formulados sinteticamente em laboratório. Tudo com o propósito de atender a demanda populacional de medicamentos sempre crescente em todo o mundo (FERREIRA,2006).

A partir de 1940, ocorreu a introdução maciça de novos fármacos, que trouxeram à população possibilidade de cura para enfermidades até então fatais, sobretudo no campo de doenças infecciosas. A “falta de informação”, sobre o uso racional de medicamentos, e a promoção farmacêutica distorcida e desenfreada levou a vários problemas, dentre os quais tem-se: escolha inadequada de medicamentos, exposições indevidas a reações adversas que podem ser fatais, aumento da automedicação e aumento da resistência bacteriana (DE MELO,2006).

A resistência a drogas de patógenos humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Estudos relatam o perigo do retorno a uma era pré-antibiótico, particularmente considerando que nenhuma nova classe de antibiótico foi descoberta nos últimos anos, apesar das intensas pesquisas das indústrias farmacêuticas. Em vista do presente cenário, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo plantas, tem ganho importância nas companhias farmacêuticas (DUARTE,2006).

Platonia insignis Mart. é uma espécie frutífera e madeireira, tem origem na Amazônia Oriental Brasileira, no Estado do Pará e é encontrada em todos os estados da Região Norte do Brasil e no Mato Grosso, Maranhão e Piauí. O bacuri é o fruto da espécie *Platonia insignis* Mart. pertencente à família Clusiaceae, subfamília Clusioideae e ao gênero *Platonia* (DOS SANTOS,2013).

As principais classes de compostos encontrados na família Clusiaceae são xantonas, cumarinas, biflavonoides e benzofenonas, produzidos pelas plantas principalmente como mecanismo de defesa. As benzofenonas das plantas da família Clusiaceae possuem propriedades incluindo anti-inflamatórios, antimicrobianos, e efeitos citotóxicos (ACUÑA et al., 2009).

Com o aumento do descarte inadequado de filmes formados por polímeros, há uma crescente preocupação mundial com a geração de resíduos industriais e, conseqüentemente com a busca de matérias primas naturais biodegradáveis, que venham substituir ou reduzir a utilização de embalagens plásticas sintéticas (CORREA,2016). Entre os materiais biodegradáveis e com potencial para formação de filmes estão as matérias primas de origem biológica, como proteínas, lipídios e polissacarídeos (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008).

Os filmes desenvolvidos com base em biopolímeros naturais, como os polissacarídeos e as proteínas, apresentam promissoras características, como existir em abundância de fonte renovável, ser economicamente viável, capaz de formar uma matriz contínua e, com propriedades como barreira a gases, capacidade de redução da perda de água, manutenção da cor e da firmeza (ASSIS; FORATO e BRITTO, 2008).

O colágeno é o principal componente de tração do aparelho musculoesquelético, com capacidade de formar fibras com alta resistência elástica. Esta molécula compreende a maior parte da matéria orgânica da pele, tendões, ossos e dentes, desempenhando um papel estrutural nos tecidos. O colágeno tem aplicação na engenharia de tecidos artificiais, por apresentar a função de orientar tecidos em desenvolvimento, sendo favorável a sua utilização como biomaterial. (VULCANI e PLEPIS, 2006; LEE *et al.*, 2001).

Atualmente é utilizado na forma de membranas, tubos, pós, esponjas e soluções injetáveis. Como membrana, têm sido aplicados na substituição de tecido natural como córnea artificial, ligamentos e em enxertos vasculares e processos cicatriciais (REZENDE, NETO, 2011).

Os biomateriais criados a partir do colágeno representam uma alternativa terapêutica com aplicação variada na área médica e odontológica, já que apresenta grande biocompatibilidade e capacidade de promover a cura de feridas (OLIVEIRA and ROCHA, 2010).

Os curativos são uma forma de tratamento das feridas cutâneas e sua escolha depende de fatores intrínsecos e extrínsecos. Os recursos financeiros do paciente e/ou da unidade de saúde, a necessidade de continuidade da utilização do curativo, inclusive com visitas domiciliares, e a avaliação de benefícios e custos são alguns dos aspectos a serem considerados no momento da escolha do tipo de curativo, que devem ser adequados à natureza, à localização e ao tamanho da ferida (FRANCO,2008).

A criação do biofilme de colágeno em pó, pode ser justificativa pela facilidade de descarte do mesmo, visto que se trata de um biomaterial que não agride o meio ambiente, além de apresenta facilidade na obtenção dos componentes da formulação, possuir atividade antimicrobiana, além da matéria-prima apresentar características cicatrizantes, espera-se também que este biofilme diminua o contato da ferida com o ambiente externo, servindo de barreira e evitando a contaminação da mesma. Dessa forma, é de suma importância estudos que comprovem a qualidade do produto criado, além dos estudos preliminares que confirmem a veracidade dos dados da literatura.

Pensando em aliar o bem estar do paciente e o acesso deste aos produtos de saúde, o mercado produtor tem cada vez mais criado e incentivado inovações que englobem tanto o uso de produtos que não agridam o meio ambiente, quanto produtos de fácil acesso à população. Dessa forma, inúmeras alternativas têm sido criadas para o tratamento de doenças que possuam um alto valor agregado ao tratamento, como por exemplo, feridas crônicas e infeccionadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DA ESPÉCIE VEGETAL

O Bacuri pertence à família botânica Clusiaceae, subfamília Clusioideae e ao gênero *Platonia*, que é um monotipo, engloba aproximadamente 1000 espécies subordinadas a 47 gêneros, dispersos em regiões tropicais, subtropicais e temperadas no mundo. Em nove desses gêneros, cerca de 90 espécies são de plantas envolvendo árvores, arbustos, lianas e ervas de interesse econômico pela produção de frutos comestíveis, madeiras nobres, derivados químicos de interesse farmacêutico e industrial (BRUMMIT, 1992; JOLY, 1993; YAACOB e TINDALL, 1995; BARROSO et al., 2002).

Platonia insignis tem sido considerado como a única espécie do gênero *Platonia*, mais conhecida como bacurizeiro. As sementes são aproveitadas na fabricação do óleo de bacuri, esse óleo é popularmente utilizado no tratamento de doenças de pele e como cicatrizante de ferimentos em animais. Esse gênero é descrito como muito rico em substâncias naturais como xantonas (euxantonas), ácidos graxos, e triglicerídeos (CLEMENT e VENTURIERI, 1990; CAVALCANTE, 1996).

Os frutos do Bacuri são bastante consumidos no norte do Brasil. A ocorrência de bacurizeiros na região norte do País abrangendo os estados do Pará, Maranhão e Piauí, os frutos possuem valor para agroindústrias e exportação de polpa (no país e no exterior), gerando renda, emprego e uma nova alternativa econômica (LIMA, 2007).

A investigação dos extratos e compostos de *P. insignis* são baseadas no uso popular. Estudos farmacológicos já realizados com essa planta apontam fonte promissora para elaboração de possíveis fitomedicamentos com atividade cicatrizante, anti-inflamatória, anticonvulsivante, antimicrobiana, citotóxica e antioxidante e diversas doenças como câncer, Alzheimer e Parkinson (SANTOS JUNIOR et al., 2010).

2.2 BIOFILMES

Filmes biodegradáveis ou biofilmes são produzidos a partir de compostos macromoleculares de obtenção biológica e requerem, no mínimo, o uso de um material capaz de formar uma matriz com estrutura contínua e com interações entre suas moléculas (BIERHALZ, 2010).

A escolha do material a ser utilizado para produção dos biofilmes depende diretamente da natureza do produto, propriedades físicas, função e da aplicabilidade. Entre as principais matérias-primas para a elaboração de filmes biodegradáveis estão as proteínas, lipídios e os polissacarídeos (WOLF, 2007).

Filmes produzidos a partir da matéria prima proteica apresentam propriedades físicas que influenciam na força de deformação de ruptura, estando diretamente ligadas ao pH da solução filmogênica produzida (SCHLLEMER, 2013).

Filmes biodegradáveis feitos apenas com soluções ou dispersões de proteínas, sem qualquer aditivo, tendem a ser quebradiços e difíceis de manusear. A adição de plasticizantes é uma alternativa para aumentar a flexibilidade dos filmes, devido à habilidade destes em reduzir pontes de hidrogênio internas entre as cadeias poliméricas, reduzindo as forças de atração inter e intramoleculares da proteína e ao mesmo tempo aumentando o espaço intermolecular entre as cadeias poliméricas (SCHROOYEN et al., 2001). Diversas substâncias são utilizadas como plastificantes, exemplo, glicerol, sorbitol, propilenoglicol, etilenoglicol dentre outros.

A técnica *casting*, útil por formar filmes não fixos, é baseada em métodos desenvolvidos para filmes não comestíveis e por isso representa um menor investimento em pesquisas, além de ser a mais utilizada para analisar as propriedades filmogênicas dos biomateriais. Ela consiste na aplicação da solução formadora de filme em moldes, permitindo o controle da espessura dos filmes através da quantidade de matéria seca depositada nos suportes (GONTARD, 1994).

2.3 COLÁGENO

O colágeno representa cerca de 30% da proteína existente no organismo de vertebrados e está presente em tecidos que possuem função mecânica, como parte constituinte de peles, tendões, ossos, dentes, vasos sanguíneos, intestinos e cartilagens (NIMNI et al., 1987; FORTI, GOISSIS e PLEPIS, 2006).

Além de desempenhar importante papel na estrutura dos tecidos, o colágeno é capaz de orientar a formação de tecidos em desenvolvimento (WILLIAM, 1987), fato altamente favorável na sua utilização como biomaterial (SILVER e DOILLON, 1989).

Em um mesmo animal é possível encontrar colágenos geneticamente distintos. Muitos deles têm sido caracterizados bioquimicamente, observando que cada tipo de tecido contém uma composição específica de colágeno (BANDMAN, 1994).

O colágeno tipo I pode ser utilizado como biomaterial pela sua excelente biocompatibilidade, devido às suas características de baixa toxicidade e imunogenicidade (MEADE e SILVER, 1990). Outra vantagem do colágeno como biomaterial é que este polímero possui estrutura, propriedades físicas, químicas e imunológicas bem elucidadas. Também pode ser rapidamente isolado e purificado em grandes quantidades (HAO, LIN e SHEU, 1997).

A forma de apresentação do colágeno pode ser como fibras ou pó, sendo insolúvel em água devido à grande concentração de aminoácidos hidrofóbicos contidos no interior da proteína (SILVA e PENNA, 2012). A permeabilidade do vapor de água no colágeno bovino, por sua vez, é menor devido à presença de lipídios.

Os biofilmes a base de colágeno são amplamente aplicados em envoltórios de embutidos cárneos, com intuito de melhorar a preservação do produto (WOLF, 2007).

2.4 CURATIVOS

O estudo e tratamento de feridas vêm sendo realizados desde o antigo Egito. Naquele tempo, as bordas da ferida limpa eram unidas com fita adesiva ou pontos e um pedaço de carne era colocado sobre a lesão. Pomadas à base de camomila e mel eram também utilizadas e suas propriedades antibacterianas e anti-sépticas foram mais tarde elucidadas. Assim, curativos e unguentos ou pomadas vêm sendo utilizados com sucesso ao longo da história e o advento da teoria dos germes, que revolucionou a medicina, trouxe impactos significativos na cirurgia e no tratamento de feridas (PIRES, 2013).

O principal objetivo no tratamento de feridas cutâneas superficiais ou de espessura parcial é a redução do tempo de restauração. Além disso, o curativo ideal

para aplicação em área doadora deve causar pouca ou nenhuma dor e gerar conforto para o paciente, reduzir infecção e o extravasamento de exsudato e resultar na formação mínima de cicatrizes, além de ser barato e fácil de usar (PINTO,2017).

Curativos com base em colágeno são práticos e facilmente aplicados devido à sua estrutura simples e relativa uniformidade, além de ampla disponibilidade (PINTO,2017). Os curativos devem também apresentar boa resistência mecânica, facilidade de aplicação e remoção, além de manter boa flexibilidade durante o processo de cicatrização (PIRES,2013).

Atualmente, esforços estão voltados para a utilização de materiais de origem biológica que, geralmente, são capazes de acelerar o processo de cura em níveis moleculares e celulares (JAYAKUMAR et al., 2011). Os polímeros naturais vêm sendo avaliados por promover a cicatrização e regeneração de tecidos, uma vez que são capazes de manter um microambiente controlado no local da lesão. O emprego de biopolímeros com diferentes propriedades mecânicas, físicas e biológicas possui grandes vantagens, tais como: biocompatibilidade e biodegradabilidade (COSTACHE et al., 2010; DANTAS et al., 2011)

2.5 PROPRIEDADES DOS FILMES BIODEGRADÁVEIS

2.5.1 Solubilidade

A solubilidade em água é uma propriedade importante dos filmes biodegradáveis no que se refere ao seu emprego, pois algumas aplicações requerem insolubilidade em água para manter a integridade do produto (PEREZ-GAGO; KROCHTA,2001).

A obtenção de filmes com boas propriedades de barreira ao vapor de água, isto é, com baixa permeabilidade dentro de uma grande faixa de umidade relativa, implica na utilização de um material de baixa solubilidade em água, ou seja, de caráter mais hidrofóbico (SAMENTO, 1999).

2.5.2 Teste de Intumescimento

O índice de intumescimento tem sido aplicado com um método gravimétrico de característica física, baseado na determinação da capacidade de absorção de água por um material ou na capacidade de absorção de umidade. O intumescimento de um determinado material pode ainda ser definido como o umedecimento de sua superfície com posterior hidratação de suas moléculas, ocorrendo uma lenta desagregação molecular, ficando o material intumescido (BIERHALZ, 2010).

Um polímero com capacidade de intumescimento, ao entrar em contato com a água, apresenta alteração do seu estado configuracional rígido ou semirrígido para um estado maleável (LOPES; LOBO e COSTA, 2005). As modificações na matriz polimérica decorrentes desse processo influenciam na difusividade de gases ou líquidos pelo do filme (BIERHALZ,2010).

2.5.3 Permeabilidade ao vapor d'água

O transporte de um gás ou vapor através de uma membrana pode ocorrer por dois mecanismos: difusão ativa e difusão capilar. A difusão capilar está mais presente em materiais porosos ou com imperfeições, enquanto que a difusão ativa envolve solubilização do gás penetrante, sua difusão e finalmente sua liberação no lado oposto do filme. Desta forma, na ausência de imperfeições, quebras, furos ou outras falhas, o mecanismo primário para o fluxo de gás ou vapor através de um filme ou cobertura comestível é a difusão ativa. Se o gás é insolúvel no filme e já o penetrou, o mecanismo predominante é o fluxo capilar (WOLF, 2007).

A permeabilidade ao vapor de água é usualmente medida pelo método gravimétrico. Um filme é selado na abertura superior de um recipiente contendo um dessecante, e então, o recipiente é colocado numa câmara à temperatura e umidade relativa (UR) constantes (ASTM, 1989). O dessecante mantém a UR ambiente baixa e constante (usualmente 0% UR) dentro do recipiente (DONHOWE; FENNEMA, 1994). A célula teste contém água destilada ou solução saturada de sal. Pesagens periódicas determinam a taxa de transmissão de água através do filme. As pesagens devem ser realizadas após a taxa constante de transporte de umidade ser alcançada no interior da câmara. Oito pesagens geralmente são suficientes (ASTM, 1989).

A permeabilidade aos vapores de água pelos filmes é fortemente dependente da umidade relativa e da temperatura em que estão acondicionados, ou seja, quanto maior a umidade relativa e a temperatura, maior é a permeabilidade e a absorção, devido ao inchamento da matriz polimérica que leva ao incremento na difusão das moléculas de água (MOORE et al., 2006). A absorção de água pelos filmes também é altamente influenciada por esses fatores (SOUZA e ANDRADE, 2000).

2.6 CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO

A qualidade microbiológica não só de fitoterápicos, mas de medicamentos e cosméticos é definida por padrões microbianos descritos em compêndios oficiais e normas regulamentadoras. Limites máximos de presença de microrganismos no produto e dentre esses, ausências de patógenos estão estipulados (FREITAS, 2007; CARVALHO et al., 2004).

A necessidade do controle microbiológico desses produtos é importante, devido, principalmente, à segurança, eficácia e aceitabilidade desses produtos. A falha nas medidas preventivas e de controle do processo de fabricação pode levar ao comprometimento do desempenho do produto devido à quebra da estabilidade da formulação, a alteração das características físicas (cor, viscosidade) e químicas (inativação do princípio ativo) do produto (NASCIMENTO et al., 2005; CARVALHO et al., 2004), com graves consequências à saúde do consumidor, pelo uso de produtos em desacordo com suas características de qualidade estabelecidas, ocasionando danos aos pacientes (SIMÕES et al., 2004; CARVALHO et al., 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver filme biodegradável à base de Colágeno em pó para aplicações em feridas, incorporados com extratos naturais que possuam atividade antimicrobiana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato bruto (EB) das folhas da espécie vegetal *Platonia insignis* Mart.
- Desenvolver um filme à base de colágeno em pó incorporado com extrato de *Platonia insignis* Mart.
- Realizar a caracterização do filme biodegradável de colágeno em pó
- Averiguar a atividade antimicrobiana do extrato liofilizado de *Platonia insignis* Mart.
- Fazer Triagem de atividade antimicrobiana do filme biodegradável de colágeno em pó incorporado com extrato liofilizado de *Platonia insignis* através do Teste de Difusão em Agar.
- Avaliar o controle microbiológico do extrato de *Platonia insignis* e filme biodegradável pronto.

4 METODOLOGIA DA PESQUISA

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE MATERIAL BOTÂNICO

As folhas da espécie vegetal foram coletadas manualmente na área urbana do município de São Luís, Maranhão – Brasil. A coleta foi realizada no mês de outubro de 2015 entre o horário de 6:00 e 7:00 da manhã. A amostra da planta foi encaminhada ao Herbário Ático Seabra da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para ser identificada e catalogada sob o número de registro 01084.

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO

Para obtenção do extrato liofilizado seguiu-se a metodologia descrita por Valério (2014) com modificações. As folhas coletadas foram submetidas à secagem em temperatura de 28 °C até as mesmas se apresentarem bem secas e quebradiças. Em seguida, as mesmas foram trituradas e colocadas em frasco de maceração, onde foi adicionado álcool etílico 70% na proporção de 1:3, sendo o solvente trocado a cada 24h por um período de 3 dias e protegido da luz. Ao fim deste processo, o extrato foi rotoevaporado e liofilizado.

4.3 PRODUÇÃO DO FILME BIODEGRADÁVEL E INCORPORAÇÃO DO EXTRATO

O pó de colágeno foi fornecido pela empresa NOVAPROM FOOD INGREDIENTS Ltda, situada na cidade de Guaiçara, interior do estado de São Paulo.

Para produção da membrana biodegradável, inicialmente, foram adicionadas no béquer a proporção de 2% de pó de Colágeno, 100 mililitros de água destilada e 1,5 ml de ácido acético glacial. Esta solução foi deixada hidratando por 24 horas em temperatura ambiente para que houvesse um aumento da solubilidade do pó do colágeno na água.

Após esse período, foi adicionado o equivalente a 1,5 gramas de plastificante (glicerol / propilenoglicol / glicerina) e a solução final foi levada ao bico de Bunsen para que a ação de altas temperaturas (95°C) formasse uma solução translúcida, que então

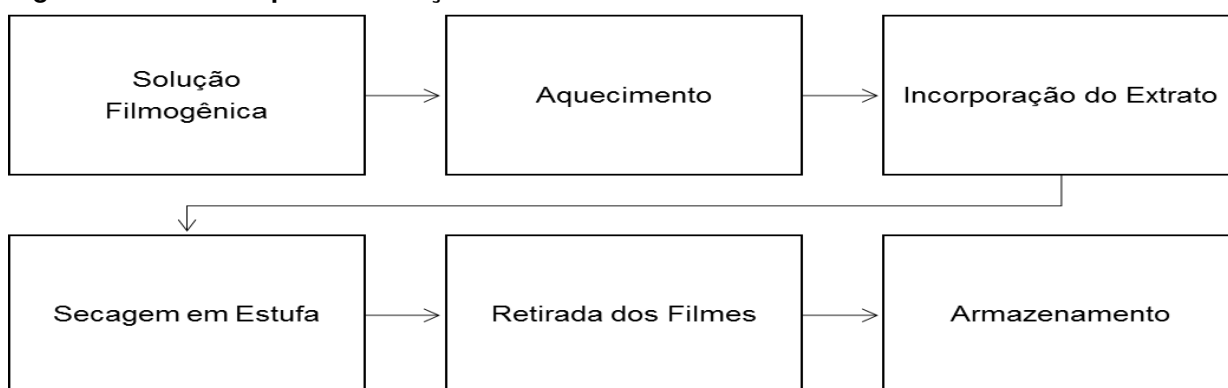
indica que o gelatinizado está formado. Durante a realização dos testes, as variáveis como, plastificantes e ácido acético glacial PA foram modificadas a fim de encontrar a formulação mais adequada.

Para a incorporação do extrato realizou-se os cálculos para identificação da concentração de extrato que deveria ser incorporado na solução, onde se obteve a concentração de 18.75% do extrato em relação a massa de colágeno utilizada.

Este cálculo foi baseado na Concentração Inibitória Mínima do extrato, pela área do filme formado e pela área dos discos do filme que serão utilizados no teste de atividade antimicrobiana.

Após a solução filmogênica formada e com a temperatura em 25 °C adicionou-se o extrato para posteriormente, a solução ser vertida em placas de petri, de acordo com a técnica de Casting (YANG & PAULSON, 2000) e deixadas na estufa a 40° para secagem e evaporação do solvente, tendo o filme formado depois de 48 a 72 horas na estufa.

Figura 1: Processos para elaboração dos filmes



Fonte: Autor (2018)

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO FILME BIODEGRADÁVEL

4.4.1 Análise Macroscópica

As membranas foram submetidas a análises macroscópicas sendo observadas as seguintes características: continuidade (ausência de rupturas e fraturas após a secagem), homogeneidade (ausência de partículas insolúveis ou visíveis ao olho nu, zonas de opacidade ou de cores diferenciadas), manuseabilidade

(possibilidade de ser manuseado sem riscos de ruptura) e capacidade de formação de uma película contínua (MONTERREY & SOBRAL, 2000).

As membranas foram classificadas de acordo com escores sendo atribuída (+1) como característica deficiente, (+2) adequada e (+3) excelente

4.4.2 Solubilidade

Os testes de solubilidade dos filmes foram realizados segundo a metodologia proposta por Gontard et al. (1992) modificada pelo autor.

Três discos da amostra de filme, com 10 cm de diâmetro, previamente pesados, foram imersos em 50 mL de água destilada e mantidos por 24 horas sob agitação constante e lenta, após o qual, foi determinado o conteúdo de matéria seca não solubilizada por secagem a 105 °C por 24 horas. A solubilidade foi calculada conforme a Equação 1:

$$\%MS = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100$$

Onde:

%MS: porcentagem de material solubilizado.

m_i : massa inicial da amostra.

m_f : massa final da amostra

4.4.3 Gramatura

A gramatura foi determinada segundo Sobral (2001) pela pesagem de uma área definida do filme em balança analítica utilizando-se a equação 2.

$$G = 10000 \cdot p/a$$

Onde:

G: gramatura (g/m^2);

P: peso do filme (g);

A: área do filme (cm^2).

4.4.4 Teste de Intumescimento

A Capacidade de absorção de água foi determinada com base na norma ABNT NBR NM ISO 535:1999 (ABNT, 1999). Amostras de filme de 10 x 10 mm, previamente pesadas, foram submersas em 100 mL de água destilada a temperatura de 21 °C pelos tempos de 1, 15, 30, 45 e 60 minutos, após os períodos de tempo, o excesso de água será retirado, com auxílio de papel toalha, e a massa final medida. A capacidade de absorção de água de cada filme será determinada através da Equação 3.

$$CAA = \frac{mf - mi}{mi} \cdot 100$$

Onde:

CAA: capacidade de absorção de água da amostra (%);

Mi: massa inicial da amostra (g);

Mf: massa final da amostra após a secagem (g).

4.4.5 Permeabilidade ao Vapor d'água

A permeabilidade foi determinada gravimetricamente segundo teste da ASTM E96-00, modificado por GONTARD et al., (1992). O filme foi colocado em célula contendo sílica gel (UR = 0%; 0 mm Hg pressão de vapor), constituindo uma membrana. A célula então foi colocada dentro de um dessecador contendo água destilada (UR = 100%; 32,23 mm Hg pressão de vapor), em sala climatizada a 25 °C. A célula foi então pesada em balança analítica a cada 24 horas. A permeabilidade será calculada através da Equação 4:

$$P_v = \frac{G \cdot V}{A \cdot T \cdot (p_1 - p_2)}$$

Em que:

P_v = permeabilidade ao vapor d'água (g.mm/m².dia.mmHg);

G = peso ganho pela célula durante 24 horas (g);

V = espessura média do filme (mm);

A = superfície de permeação do filme (m²);

T = tempo (dias);

$p_1 - p_2$ = gradiente de pressão de vapor entre as superfícies do filme (32,23 mmHg).

4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DO EXTRATO LIOFILIZADO DE *P.insignis* E DOS FILMES INCORPORADOS COM O EXTRATO

4.5.1 Seleção dos Microrganismos

Foram utilizados os microrganismos presentes no estoque do Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Federal do Maranhão, serão utilizados microrganismos padrão ATCC (ATCC - American Type Culture Collection):

- ✓ Bactérias Gram-positivas - *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- ✓ Bactérias Gram-negativas - *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27883) e *Escherichia coli* (ATCC 25922)
- ✓ Levedura – *Candida albicans* (ATCC 90028)

4.5.2 Preparo das suspensões bacterianas

Os microrganismos foram reativados a partir das suas culturas originais e mantidos em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) a 37°C por 24 horas. Posteriormente, as amostras vão ser cultivadas em placas de Ágar Nutriente a 37°C por 24 horas para bactérias e 48 horas para fungo. Colônias isoladas foram ressuspensas em 2 mL de solução fisiológica (NaCl 0.9 %) estéril até atingir uma turbidez equivalente a 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

4.5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima do Extrato Bruto

A determinação da CIM será feita através da técnica de microdiluição segundo a metodologia da diluição em caldo proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). As placas de 96 poços estéreis serão preparadas com 150µL de caldo BHI e 150µL do produto a ser testado seguido de diluições seriadas, cada inóculo de bactéria será transferido para os poços e levados à estufa a 35°C por 24 horas, após o período de incubação será adicionado o revelador de crescimento microbiano resazurina a 0,1% e realizada a leitura após 4 horas de incubação (Palomino et al., 2002; Araújo; Longo, 2016; Estevam et al., 2016). A CIM será a menor concentração da solução onde não houve crescimento bacteriano visível.

4.5.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima do Extrato Bruto

Serão utilizadas as placas incubadas para determinação da CIM em meio líquido para determinação da CBM. Uma alçada de cada poço será inoculada em placas de Ágar Müeller Hinton e posteriormente incubadas em ambiente à 35°C por 24h. As CBM's serão consideradas para a menor concentração da solução onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9% de morte microbiana).

4.5.5 Teste de Difusão em ágar do Biofilme incorporado com extrato liofilizado de *Platonia insignis* Mart.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada utilizando a metodologia de difusão em disco descrita por Bauer et al. (1966) modificado. Assim, foram feitos discos de 13 mm de diâmetro do filme testado. Os discos serão depositados sobre a superfície do meio semeado com as suspensões microbianas padronizadas de acordo com a turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mcfarland, em placas de Petri. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas para bactérias e 48 horas para a levedura. Após o período de incubação realizou-se a leitura dos resultados, pela medição do diâmetro do halo de inibição formado em volta do disco. Os testes foram realizados em triplicata.

4.6 CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO

O Controle de qualidade microbiológico foi avaliado pela Técnica de Tubos Múltiplos seguindo a metodologia preconizada pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Os produtos foram diluídos na proporção 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em solução NaCl 0.90% e posteriormente retirou-se 1.000µL de cada diluição e adicionou-se em tubos contendo 9 mL de caldo Lauryl (Merck®), caldo Verde brilhante (Coliformes totais) (Himedia®) e caldo *Escherichia coli* (caldo EC) (Coliformes termotolerantes) (Himedia®) respectivamente.

Para a contagem de microrganismos heterotróficos foi realizada a técnica de Plaqueamento em Profundidade ("Pour Plate"), sendo inoculado 1.000µL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em meio PCA (Plate Count Agar) (Himedia®).

Para a verificação de crescimento fúngico utilizou-se a técnica de Plaqueamento em Superfície (“Spread Plate”), onde foi inoculado 100uL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em meio Sabouraud (Merck®) e posterior espalhamento com alça de Dringalski na superfície do meio. As placas de PCA foram encubadas em estufa bacteriológica 35°C 24 horas e as placas Sabouraud por até 48 horas.

Os tubos contendo caldo Verde brilhante foram incubados em banho-maria SI 150 (Solab®) temperatura controlada de 37°C por 24 horas, os tubos contendo caldo EC incubados em banho-maria a 44,5°C 24 horas e posterior leitura com 48horas. Os tubos contendo caldo Lauryl foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 24horas. A positividade do teste é considerada pela presença de turvação e formação de bolhas (gás) dentro do tubo de Durham presente no interior do tubo contendo o meio.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DO EXTRATO

Calculou-se o rendimento total dos extratos, de acordo com a Equação 5:

$$Re = \frac{P_{ext}}{P_{folhas}} \times 100$$

Onde: Re = Rendimento total do extrato (%); P.ext. = Peso do extrato seco(g); Pfolhas = Peso das folhas frescas ou secas (g) (Rodrigues et al., 2011).

Rendimento do extrato das folhas de *Platonia insignis*: A partir de 112g de folhas secas e moídas, rendeu 11g de extrato liofilizado, apresentando rendimento final de 9,82%.

5.2 PRODUÇÃO DOS BIOFILMES E INCORPORAÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO DE *Platonia insignis* MART.

Para a produção dos Biofilmes foram testadas algumas modificações nas matrizes utilizadas. Produziu-se filmes com a presença/ou ausência de ácido acético glacial PA, glicerol/propilenoglicol/glicerina. Tendo seus resultados expostos na tabela1.

Tabela1: Comparação dos filmes quanto a presença de ácido e ao tipo de plastificante

	Glicerol	Glicerol+ácido	Propilenoglicol	Propilenoglicol+ácido	Glicerina+ácido
Colágeno	Formação de filme áspero e quebradiço	Formação de filme liso, manuseável e translúcido	Formação de filme rígido e quebradiço	Formação de filme rígido, de cor escura e com rugosidades em sua superfície	Filme fino, manuseável, porém com facilidade de rompimento

Fonte: Autor (2018)

Diante de todos as formulações, o filme escolhido para dar continuação nos testes foi o de Colágeno a 2%, glicerol e ácido acético glacial, pois foi o que apresentou, dentre os outros, características mais viáveis para a produção do Filme.

O ajustador de pH deve ser utilizado, principalmente em filmes a base de proteínas, por atuar na solubilidade dos mesmos. O ajustador de pH faz com que as proteínas permaneçam solúveis, permitindo, portanto, a geleificação. Normalmente, em caso de proteínas utiliza-se o ácido acético glacial como ajustador de pH da solução e solubilizado do colágeno em pó (WOLF, KLEBER, 2007).

Filmes biodegradáveis feitos apenas com soluções ou dispersões de proteínas, sem qualquer aditivo, tendem a ser quebradiços e difíceis de manusear. A adição de plasticizantes é uma alternativa para aumentar a flexibilidade dos filmes (SCHROOYEN et al., 2001).

Em estudos onde 4 tipos de plasticizantes (glicerol, propilenoglicol, etilenoglicol e dietilenoglicol) foram utilizados em filmes de gelatina, o glicerol mostrou-se de maneira geral, maior efeito e eficiência plasticizante (WOLF, KLEBER, 2007).

De acordo com os resultados da CIM, para que os discos de filme inibam o crescimento dos microrganismos é necessário a incorporação de 375 mg de extrato na solução filmogênica, o que corresponde a 18.75 % de extrato em relação a massa do colágeno utilizado.

5.3 TESTES DE CARACTERIZAÇÃO

5.3.1 Análise Macroscópica

Os Filmes feitos a partir do colágeno a 2%, glicerol e ácido acético glacial apresentou melhor maneabilidade, força de tração, continuidade e homogeneidade, quando comparados com as outras formulações para produção dos filmes, o que está contido na tabela 2.

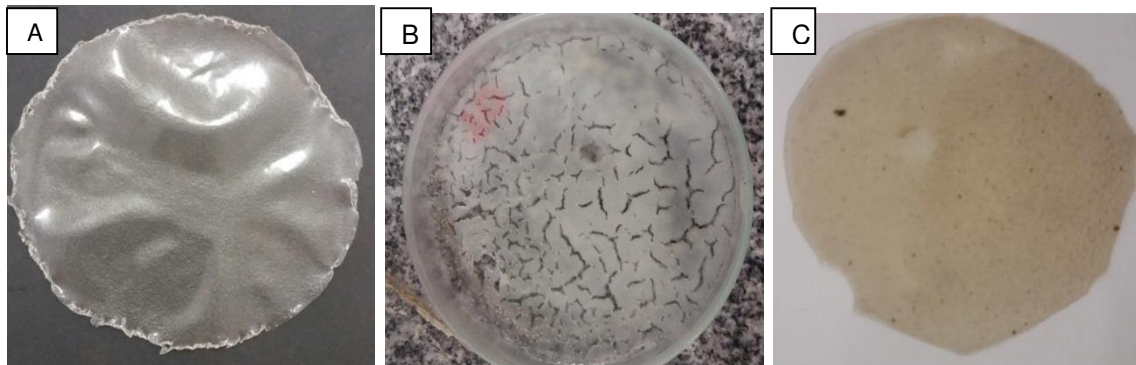
Tabela 2: Análise Subjetiva Dos Biofilmes

Formulação	Homogeneidade	Continuidade	Manuseabilidade
Colágeno+ glicerol + ácido	3	3	3
Colágeno+ Propilenoglicol+ ácido	2	2	1
Colágeno+glicerol	2	2	1
Colágeno+propilenoglicol	1	1	1

Legenda: 1 – deficiente, 2 – boa, 3 – excelente.

Fonte: Autor (2018)

Figura 2: Filme Base de Colágeno em pó adicionado de Glicerol e Ácido acético glacial (a), Filme de Colágeno com propilenoglicol sem adição de ácido acético glacial (b), Filme de Colágeno com propilenoglicol e ácido acético glacial (c).



Fonte: Autor (2018)

Filmes biodegradáveis feitos apenas com soluções ou dispersões de proteínas, sem qualquer aditivo, tendem a ser quebradiços e difíceis de manusear. A adição de plasticizantes é uma alternativa para aumentar a flexibilidade dos filmes, devido à habilidade destes em reduzir pontes de hidrogênio internas entre as cadeias poliméricas, reduzindo as forças de atração inter e intramoleculares da proteína e ao mesmo tempo aumentando o espaço intermolecular entre as cadeias poliméricas e diminuindo a temperatura de transição vítrea (BANKER, 1966). Com isso, ocorre um aumento da resistência mecânica do filme e diminuição de possíveis descontinuidades e zonas quebradiças.

Um outro composto que pode ser encontrado na formulação de biofilmes é o ajustador de pH, o qual deve ser utilizado, principalmente, em filmes a base de proteínas, por atuar diretamente na solubilidade das mesmas. O ajustador de pH faz com que as proteínas permaneçam solúveis (distantes de seus pontos isoelétricos), permitindo, portanto, sua geleificação. Normalmente, nos casos das proteínas, usa-se o ácido acético glacial como tal componente.

Dessa forma, os biofilmes com 2% de colágeno mais adição do glicerol e ácido acético, foi a formulação de escolha, pois apresentou vantagem frente as outras formulações, pois foi o que apresentou continuidade, manuseabilidade e homogeneidade superior as outras formulações testadas.

5.3.2 Solubilidade

A solubilidade em água e o intumescimento pelo contato direto com água líquida são propriedades importantes dos filmes biodegradáveis, uma vez que para várias aplicações é necessário conhecer a resistência do material à água.

O filme biodegradável apresentou-se íntegro após as 24 horas imerso em água e sob agitação, o que pode ser explicado pelo fato do colágeno em pó ser uma substância parcialmente insolúvel em água.

O Teste de solubilidade obteve o valor de $M\% = 2.59\%$, demonstrando assim, que o filme apresenta pequena solubilidade em água, mantendo sua integridade quando em contato com ambientes úmidos.

Filmes com plasticizantes hidrofílicos tendem a apresentar altos valores de solubilidade. Contudo, os resultados obtidos aqui são relativamente menores do que os encontrados por Lee et al. (2016), que elaboraram filmes compostos por gelatina e gelatina em presença de NaCl e plasticizados por glicerol, variando suas proporções, e que apresentaram solubilidade de 30 a 52%. O intumescimento de filmes e a sua integridade após o teste de solubilidade também são fatores importantes a serem observados. Todos os filmes testados permaneceram íntegros após as 24 h de imersão em água a que foram submetidos, o que indica que a rede protéica se manteve intacta (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000).

5.3.3 Gramatura

O valor médio para a gramatura do biofilme foi de 235,97 g/m².

A gramatura de filmes é definida como a massa de uma determinada área do material e está se relaciona diretamente à resistência mecânica dos filmes. Maiores gramaturas oferecem maiores resistências mecânicas (OLIVEIRA et.al.,1996).

Como a gramatura é calculada em função de uma área conhecida do material e seu peso, os valores obtidos de gramatura para o filme biodegradável, foi superior a gramatura do plástico PVC, que apresenta valor de 40,95 g/m², e similar aos filmes de amido modificado, com valores de gramatura que variam em torno de 200 a 500 g/m² (HENRIQUE et.al,2008). De acordo, com os resultados obtidos no teste e dos dados da literatura, o filme biodegradável de colágeno em pó apresenta resistência

mecânica cerca de 5 vezes superior aos filmes de pvc, utilizados como embalagens, sendo portanto mais resistentes e menos flexíveis que o mesmo.

5.3.4 Teste de Intumescimento

O índice de intumescimento está diretamente relacionado à solubilidade em água, sendo um parâmetro importante para o conhecimento das características gerais de um material, principalmente com relação à resistência deste material a água.

A capacidade de absorção de água em função do tempo para os filmes preparados com 2% de Colágeno está demonstrada na tabela 4.

Tabela 3: Resultado do teste de CAA em função do tempo

Tempo(minuto)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	%
1	0.0218	0.0317	45.41
15	0.0261	0.0746	185.82
30	0.0240	0.0758	215.83
45	0.0265	0.0983	270.94
60	0.0216	0.0897	315.27

Fonte: Autor(2018)

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que os pesos dos filmes aumentou em função do tempo. Em geral espera-se que isso aconteça devidos as características do glicerol, pois o mesmo apresenta acentuada higroscopicidade.

A absorção de água de um curativo deve prevenir a desidratação excessiva e o acúmulo de exsudatos. Desta forma, considera-se que com uma absorção de água moderada, isto é, em torno de 200 %, os filmes podem absorver o excesso de exsudatos e ainda manter o ambiente do ferimento úmido o suficiente para não se tornar desconfortável ao paciente (SHOJAEE et al., 2015).

5.3.5 Permeabilidade de Vapor d'água

A natureza hidrofílica das proteínas torna os filmes proteicos uma barreira mínima à umidade. Soma-se a isto a necessidade de incorporação de plastificantes, compostos que possuem, também, natureza hidrofílica (BARRETO, 2003). O valor da taxa de permeabilidade ao vapor d'água está expresso na tabela 4.

Tabela 4: Valores expressos de peso ganho da célula, em gramas, e permeabilidade aos vapores de água (PVA), em $\text{g.mm/m}^2.\text{dia.mmHg}^{-1}$ do filme base.

Amostra do filme	Peso ganho (g)	PVA($\text{g.mm/m}^2.\text{dia. mmHg}^{-1}$)
Filme base	1.8405	9.31

Fonte: Autor (2018)

A determinação da PVA é um método simples e fácil de avaliação da permeabilidade de membranas poliméricas quando comparado aos tradicionais métodos de difusão. Resultados de WVT oferecem valiosa informação sobre proteção oferecida pela membrana em relação às variações de umidade do meio (REZENDE NETO, 2011).

De acordo com Matta Junior et al. (2011), as propriedades de barreira dos filmes dependem da temperatura e da umidade relativa do ambiente, das características do biopolímero e da interação entre o polímero e o permeante, associada à polaridade.

O valor encontrado no teste foi similar ao encontrado por Davanço et al., com filmes compostos de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou capríco ($1,9 \pm 0,4$ e $8,3 \pm 0,4 \text{ g.mm/m}^2.\text{dia.KPa}$) e Fakhouri et al., com filmes a base de amido e gelatina onde a permeabilidade ao vapor de água variou de 4,22 a 5,53 $\text{g.mm/m}^2.\text{dia.kPa}$ para os filmes. Para o cálculo de PVA é importante a medição da espessura do filme biodegradável. O valor de espessura para o filme foi de 0.32 mm. Nakashima (2016), produziu filmes de colágeno com adição de óleo essencial de cravo da Índia, obtendo valores de espessura que variavam de 0.02 mm a 0.04 mm, mesmo padronizando o volume adicionado nas placas, demonstrando que esses valores são variáveis, pois dependem diretamente do volume da solução que é adicionado no molde.

5.4 TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.4.1 Atividade antimicrobiana do extrato liofilizado das folhas de *Platonia insignis* Mart. (Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima - CIM e CBM)

O extrato apresentou atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos testados, com CIM entre 3,12 e 6,25 mg/mL e CBM entre 6,25 e 12,5 mg/mL. A menor CIM encontrada foi de 3,12 mg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e 6,25mg/mL para *Staphylococcus aureus*. Para todos os microrganismos testados o extrato apresentou ação bactericida, ou seja, foi capaz de causar morte dos microrganismos, conforme mostra a tabela 5.

Tabela 5: Atividade antimicrobiana do extrato bruto liofilizado das folhas de *Platonia insignis* Mart. (Bacuri)

Microrganismo	CIM¹	CBM¹
<i>S. áureos</i> ATCC 25923	6.25	6.25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3.12	12.5
<i>E.coli</i> ATCC 25922	3.12	6.25

(1) CIM e CBM do extrato em mg/mL obtido a partir das folhas de *Platonia insignis* Mart. a 50mg/mL Mart. Fonte: Autor (2018)

Segundo Duarte (2006), há critérios para a classificação da atividade antimicrobiana de extratos de acordo com a Concentração inibitória mínima, contidos na tabela 6.

Tabela 6: Classificação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais.

CIM'S do extrato	Resultados
Até 5 mg/mL	Inibição Alta
Entre 6 e 15 mg/mL	Inibição Moderada
Acima de 16 mg/mL	Inibição Baixa

Fonte: Duarte, 2006

Seguindo esse critério o extrato das folhas de *P. insignis* apresenta uma atividade inibitória de moderada a alta.

Esse resultado sugere que o extrato hidroetanólico liofilizado de *Platonia insignis* Mart possui atividade antimicrobiana tanto para bactérias, gram negativas e positivas. Sendo esses microrganismos, patogênicos e de interesse clínico, fato relevante para a escolha do extrato e para a continuidade dos testes.

5.4.2 Atividade Antimicrobiana do Filme Biodegradável Incorporado com Extrato liofilizado de *Platonia insignis* Mart.

A tabela 7 apresenta os halos de inibição do crescimento do microrganismo devido à presença dos discos de 13 mm de diâmetro para os filmes confeccionados e suas devidas concentrações.

Tabela 7: Halos de inibição formados pela presença de filmes incorporados com extrato de *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) frente microrganismos de interesse clínico pelo método de difusão em ágar.

Microrganismos	P.I. 5%	P.I. 18.75%	**C+	*C-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0 mm	20mm	36.5 mm	0mm
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0 mm	19.5 mm	46 mm	0mm
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0 mm	20.5 mm	35 mm	0mm
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	0 mm	16.5 mm	27 mm	0mm

(**) Cloranfenicol 0,02mg/ml e nistatina (100.000 ui); (*) Base do biofilme.; P.I. 5%: Biofilme Bacuri à 5%; P.I. à 18.75%.

Fonte: Autor (2018).

De acordo com a tabela 7, foi possível inferir que os filmes biodegradáveis incorporados com o extrato de *Platonia insignis* Mart. apresentaram atividade antimicrobiana frente às cepas testadas na concentração de 18.75%.

O filme base também foi testado, porém o mesmo não apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados, descartando assim, que a base do filme possua atividade antimicrobiana isolada.

Como não existe um padrão sobre o nível aceitável para determinar a eficácia de extratos de plantas utilizou-se como critério para a determinação da atividade antimicrobiana a presença de halo de inibição igual ou superior a dez 10 milímetros (AL-HEBSHI et al, 2006; OSTROSKY et al, 2008) (Tabela 8).

Tabela 8: Critério de avaliação da atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em ágar

Diâmetro(mm)	Resultado
Acima de 20	Boa Atividade
Entre 15 e 20	Moderada Atividade
Entre 10 a 15	Baixa Atividade
Ausência de Halo	Inativo

Fonte: AL-HEBSHI et al, 2006; OSTROSKY et al, 2008

De acordo com os critérios definidos na Tabela 8 e os resultados contidos na tabela 8, os biofilmes apresentaram de moderada atividade à boa atividade frente as cepas testadas.

Em estudo realizado por Bastos (2015), foi testado o extrato do mesocarpo de *Platonia insignis* frente *C. albicans* obtendo halo de inibição de 15 mm. Este resultado, é muito similar quando comparado ao resultado obtido pelo teste de disco difusão do Biofilme onde o halo de inibição foi de 16.5 mm.

Souza (2018), realizou testes com extrato etanólico e com a fração hexânica do mesocarpo da *Platonia insignis* contra bactérias gram positivas e gram negativas. O teste de susceptibilidade para a avaliação da atividade antibacteriana, mostrou que nas concentrações testadas a Fração-Hexânica mostrou atividade inibitória significativa contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* na concentração de 25,0 µg/mL, e atividade bactericida para *Staphylococcus aureus* na concentração de 50,0 µg/mL.

Esses dados corroboram com os resultados obtidos durante este estudo e confirmam a importância da continuidade dos testes, pois demonstram o potencial biológico contra bactérias patogênicas, servindo de incentivo para se buscar alternativas que aliem a utilização de produtos naturais e a inovação tecnológica.

S. aureus encontrado nas fossas nasais ou na pele de neonatos, crianças e adultos pode, a partir desses sítios, alcançar outras regiões da pele e das mucosas. Caso as barreiras naturais, isto é, pele e mucosas, estejam comprometidas por trauma ou cirurgia, o *S. aureus* pode se alojar no tecido e provocar uma lesão local. O *S. aureus* é frequentemente isolado de feridas cirúrgicas infectadas, que podem representar focos para desenvolvimento de infecções sistêmicas (RODRIGUES, ROBSON, 2017).

Em infecções hospitalares, pós procedimentos cirúrgicos, os microrganismos mais frequentemente envolvidos são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase-negativos*, *Pseudomonas sp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.* e *Proteus sp.* (KEMPFER et.al.2010). Sendo esses microrganismos patogênicos e de interesse clínico.

Vários estudos demonstram que *Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos encontrados em amostras de sangue de pacientes queimados com bacteremia, com letalidade de aproximadamente 30%.

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria pertencente à ordem Pseudomonadales e consiste num bacilo gram negativo aeróbico. Sua ação em pacientes queimados vai desde pneumonias até bacteremias. As fontes de infecção podem ser água, flores, grades das camas hospitalares, superfície dos balcões e o próprio colchão do paciente. Pode ocorrer também transmissão por contato pessoal, já que algumas pessoas têm *Pseudomonas aeruginosa* como microbiota normal. Em tecidos não queimados pode causar lesões metastáticas, como a ectima gangrenosa. Este gênero apresenta grande taxa de resistência a antimicrobianos, provavelmente devido a características das porinas da parede celular, que acabam por ejetar o antibiótico da célula antes mesmo de ele fazer efeito (REMPEL et.al.2011).

Em um estudo de coorte realizado com crianças e adolescentes admitidos em um hospital universitário de Belo Horizonte, constatou que *E. coli* e *Staphylococcus aureus* foram os principais patógenos das infecções de sítio cirúrgico intra hospitalar (paciente hospitalizados) e extra hospitalar (pacientes que receberam alta). (MARTINS et.al.2008).

Microrganismos fúngicos, especialmente espécies de *Cândida*, e outros como *Aspergillus* e *Mucor* estão associados a graves infecções em pacientes queimados. *Candida spp.* é a causa mais comum de sepse fúngica. Infecções fúngicas oportunistas ocorrem em tais pacientes devido à situação imunológica alterada e

comprometida do hospedeiro. O fator mais importante para colonização fúngica é a imunossupressão causada pela própria queimadura, já que linfócitos T, células natural killer e fagocitose são requerimentos para combater a colonização e infecção profunda (DE OLIVEIRA and SERRA,2011).

O cuidado da ferida implica manutenção da perfusão tissular e preservação dos tecidos viáveis. Inclui a manutenção da ferida limpa e úmida, prevenção de infecções e proteção contra traumas, promoção da cicatrização, mantendo a mobilidade e funcionamento da parte afetada (STUCHI et.al. 2010).

5.5 CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO

Foi avaliado o padrão de qualidade microbiológico do extrato liofilizado de *Platonia insignis* e do filme biodegradável incorporado com o extrato de *Platonia insignis* Mart (tabela 9).

Tabela 9 – Avaliação do controle de qualidade microbiológico do Filme Biodegradável incorporado com o extrato de *Platonia insignis* Mart.

Parâmetros	Análise presuntiva	Microrganismos heterotróficos	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes	Análise fúngica
Meio de cultura	Caldo Lauryl	Plate Count Agar	Caldo Verde Brilhante	Caldo <i>Escherichia coli</i> (EC)	Ágar Sabouroud
Extrato <i>Platonia insignis</i> Mart.	-	-	-	-	-
Filme Biodegradável Incorporado com extrato	-	-	-	-	-

- Ausência de crescimento microbiano;

Fonte: Autor (2018).

De acordo com as Boas Práticas em Farmácia, os produtos farmacêuticos devem possuir qualidade compatível com especificações determinadas por códigos

oficiais, visando assegurar seu uso. A qualidade microbiológica da matéria-prima empregada nas formulações de medicamentos e cosméticos é fator primordial para se alcançar eficiência e segurança (ANDRADE,2005). A ausência de crescimento microbiano nas amostras pode estar relacionada as boas práticas de manipulação adotadas no preparo das formulações preconizadas pela RDC nº 67/07 que são práticas requeridas para manutenção da integridade do produto e proteção do usuário.

Os limites microbianos de produtos acabados podem se constituir em ausência absoluta de formas viáveis (produtos estéreis) ou sua presença em grandezas definidas, restritos ou não a determinadas cepas (SAFAR, 2012). A Farmacopeia Brasileira (5ª edição) indica os limites microbianos preconizados para produtos farmacêuticos não estéreis. Os limites aceitáveis para preparações de uso tópico estão contidos na tabela 10.

Tabela 10: Limite Microbiano para produtos não estéreis

Vias de administração	Contagem total de bactérias aeróbias UFC/g ou mL	Contagem total de fungos/leveduras UFC/g ou mL	Pesquisa de Patógenos
Preparação uso tópico (oromucosa, nasal, gengival, cutâneo, auricular)	10 ³	10 ²	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em 1g ou mL

10² UFC: valor máximo aceitável = 200, 10³ UFC: valor máximo aceitável = 2000.

Fonte: ANVISA (2010).

Os resultados obtidos nos testes confirmam a qualidade da matéria-prima utilizada, da manipulação durante toda a realização dos experimentos.

6 CONCLUSÃO

Mediante os resultados conclui-se que:

- Foi possível obter o extrato liofilizado das folhas da *P.insignis*, com rendimento satisfatório.
- Produziu-se filmes biodegradáveis de colágeno em pó. Os filmes apresentaram boa coesão, fácil manuseabilidade, além de se apresentarem lisos e homogêneos e com adequada difusão do extrato na malha do Filme.
- Os testes de caracterização deram resultados satisfatórios para todas as variáveis testadas, sendo portanto, filmes com baixa solubilidade em água e capacidade de absorção de água de moderada a alta
- Os testes biológicos demonstraram atividade antimicrobiana do extrato e das formulação do Filme Biodegradável a partir das folhas de *P. insignis* frente microrganismos de importância clínica;
- Os testes de controle de qualidade microbiológica, confirmam a ausência de bactérias e fungos, demonstrando que foi realizada adequada manipulação para obtenção do bioproduto.

É importante salientar, a necessidade de testes adicionais para verificação da estabilidade da formulação, testes de resistências mecânica, análise de citotoxicidade e efeitos farmacológicos. Dessa forma, a continuidade da pesquisa é de suma importância para avaliar a atividade e os efeitos do biofilme em todos esses tópicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - Associação Brasileira de normas Técnicas; NBR NM ISO 535: 1999, **Catálogo ABNT**, ABNT: São Paulo, 1999.

ACUÑA, U. M.; JANCOVSKI, N.; KENNELLY, E. J. Polyisoprenylated benzophenones from Clusiaceae: potential drugs and lead compounds. **Curr Top MedChem** 9: 1560-1580, 2009.

AL-HEBSHI, N.; AL-HARONI, M.; SKAUG, N. In vitro antimicrobial and resistancemodifying activities of aqueous crude khat extracts against oral microorganisms. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 3, p. 183-188, 2006.

ANDRADE, Flávia RO. Análise microbiológica de matérias primas e formulações farmacêuticas magistrais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, 2005.

ARAUJO, M. M. de; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de Escherichia coli e Staphylococcus aureus. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 83, 2016.

ASSIS, G.; FORATO, A.; BRITTO, A.de. Revestimentos comestíveis protetores em frutos minimamente processados. **Higiene Alimentar**, v.22, n.160, p. 99-106, 2008.

ASTM. **Annual Book Standards**. Philadelphia, PA, 1989: American Society for Testing Material.

BANDMAN, E. Química de los tejidos animales. In. PRICE, J.F.; SCHWEIGERT, B.S. "**Ciência de la carne y de los productos carnicos**", Ed. Acribia, 2ª edição, Zaragoza, Espanha, 1994.

BANKER, G.S. Films coating theory and practice. **Journal of Pharmaceutical Science**. V.55n.1. p.81-89, 1966.

BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Farmacopeia Brasileira: volume 1. 5. ed. Brasília, 2010.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de angiospermas no Brasil**. Viçosa, MG: UFV, v. 1. 2. ed., 2002. 309 p.

Barreto, P.L.M.; Pires, A.T.N.; Soldi, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polymer Degradation Stability**, 79, p.147- 152. 2003.

BASTOS, Ivanildes dos Santos et al. **Avaliação da atividade antibacteriana, antifúngica e antimalárico de extratos, frações e composto obtidos de plantas da Região Amazônica**. 2015.

BAUER, A. W. KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol.**, v. 45, p.493-496, 1966.

BIERHALZ, Andréa K. **Confecção e caracterização de biofilmes ativos à base de pectina btm e de pectina btm/alginato reticulados com cálcio**.137 f. Tese (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia de Processos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

BRUMMIT, R. K. **Vascular plant families and genera**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. 804 p.

CARVALHO, A. et al. Controle de qualidade microbiológica de produtos farmacêuticos, cosméticos e fitoterápicos produzidos na Zona da Mata. In: **Congresso Brasileiro De Extensão Universitária**. 2004. p. 42-47.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6. ed. Belém: CNPq: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1996. f 279.

CLEMENT, C. R.; VENTURIERI, G. A. *Bacuri and cupuassu*. In: NAGY, S.; SHAW, P. E.; WARDOWSKI, W. G. (Ed.). **Fruits of tropical and subtropical origin: composition, properties and uses**. Lake Alfred: Florida Science Source Inc., 1990. p. 178-192

CLSI, **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013. **Cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. -- 1. ed. -- Brasília: ANVISA, 2004.

CORREIA, Marília Ferreira. **Produção e caracterização físico-química de filmes a base de colágeno bovino, ágar-ágar e agarose**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

COSTACHE, Marius C. et al. Polymer-xerogel composites for controlled release wound dressings. **Biomaterials**, v. 31, n. 24, p. 6336-6343, 2010.

DANTAS, M. D. M. et al. Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 105, n. 1, p. 51-59, 2011.

DAVANÇO, T.; TANADA-PALMU, P.; GROSSO, C. Filmes compostos de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou capríco: efeito do pH e da adição de surfactantes sobre a funcionalidade dos filmes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p.408-416, 2007.

DE MELO, Daniela Oliveira; RIBEIRO, Eliane; STORPIRTIS, Sílvia. A importância e a história dos estudos de utilização de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, p. 475-485, 2006.

DE OLIVEIRA, Felipe Ladeira; SERRA, Maria Cristina do Valle Freitas. Infecções em queimaduras: revisão. **Rev Bras Queimaduras**, v. 10, n. 3, p. 96-9, 2011.

DOS SANTOS, Patricia Régia Pereira et al. Levantamento das propriedades físico-químicas e farmacológicas de extratos e compostos isolados de *Platonia insignis* Mart. uma perspectiva para o desenvolvimento de fitomedicamentos. **Rev. Bras. Farm**, v. 94, n. 2, p. 161-168, 2013.

DONHOWE, G.; FENNEMA, O. Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions, and testing methods. In: KROCHTA, J.M.; BALDWIN, E.A.; NISPEROSCARRIEDO, M. (Eds.). **Edible Films and Coatings to Improve Quality**. Lancaster: Technomic Publishing Co.; p.1-24, 1994.

DUARTE, Marta Cristina Teixeira. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006

ESTEVAM, E. B. B. et al. Composição Química e Atividades Biológicas dos Óleos Essenciais das Folhas Frescas de *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae). **Rev. Virtual Quim**. 2016, 8 (6), 1842-1854.

FAKHOURI, F.M.; FONTES, L.C.B.; GONÇALVES, P.V.D.M.; MILANEZ, C.R., STEEL, C.J., COLLARES-QUEIROZ, F.P. **Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson.**

FERREIRA, M. Aspectos sociais da fitoterapia. **Embrapa Rondônia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.

FIRMO, Wellyson da Cunha Araújo et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, 2012.

FORTI, F.L.; GOISSIS, G.; PLEPIS, A.M. Modifications on collagen structures promoted by 1, 4-dioxane improve thermal and biological properties of bovine pericardium as a biomaterial. **J. Biomater Appl**, 20(3): 267-285, 2006.

FRANCO, Diogo; GONÇALVES, Luiz Fernando. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Rev Col Bras Cir**, v. 35, n. 3, p. 203-6, 2008.

FREITAS, A. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira.** Ministério da Saúde. Brasília – DF, 2007. [acesso em 16 de maio de 2010]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/estudo_fitoterapicos.pdf.

GONTARD, N. Edible and biodegradable films: study of wheat gluten film forming properties. C.R. **Acad. Agric. Eng.**, v. 80, p. 109-117, 1994.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.-L. Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 190-195, jan. 1992.

HAO, H-O.; LIN, L-H.; SHEU, M-T. Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as drug carrier. **J. Contr. Rel**, 44(2/3): 103-112, 1997.

HENRIQUE, C.M. **Caracterização de filmes de féculas modificadas de mandioca como subsídios para aplicação em pós-colheita de hortícolas.** Botucatu - São Paulo, 2002. [Tese de Doutorado. Universidade estadual de São Paulo (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônomicas].

HENRIQUE, Celina Maria; CEREDA, MarneyPascoli; SARMENTO, Silene Bruder Silveira. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de 42 amidos modificados de mandioca: Physical characteristics of cassava modified starch films. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p.231-240, 2008.

JAYAKUMAR, R. et al. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 3, p. 322-337, 2011.

JOLY, A. B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Editora Nacional, 11 ed., v. 4, 1993.

KEMPFER, Cláudia Barbisan et al. Culturas de secreções de pele: estudo de prevalência e sensibilidade aos antimicrobianos em um hospital universitário. **Saúde (Santa Maria)**, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2010.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biometical applications of collagen. *Int. j. Pharm.*, vol.221. 2001. pág.1-22.

LIMA, C. M. (Org.). **Bacuri: Agrobiodiversidade**. 1. ed. São Luis, 2007. 200p.

LOPES, Carla Martins; LOBO, José Manuel Sousa; COSTA, Paulo. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Porto, v. 41, n. 2, p.143-155, abr. 2005. Trimestral.

MARTINS, Maria A. et al. Vigilância pós-alta das infecções de sítio cirúrgico em crianças e adolescentes em um hospital universitário de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, p. 1033-1041, 2008.

MATTA JR, Manoel D. da et al. Propriedades de barreira e solubilidade de filmes de amido de ervilha associado com goma xantana e glicerol. *Polímeros*, v. 21, n. 1, p. 67-72, 2011.

MEADE, K.R.; SILVER, F.H. Immunogenicity of collagenous implants. *Biomat.*, v.11, p.176-180, 1990. ACKERMANN, T. **Fast chromatography study of propolis crude**. **Food Chemistry**, 42(2) : 135-138, 1990.

MICHELIN, D. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, n. 4, p. 316-20, 2005.

MONTERREY-QUINTERO, E.S.; SOBRAL, P.J. do A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.179-189, 2000.

NAKASHIMA, Ailim Yuki; CHEVALIER, Raquel Costa; CORTEZ-VEGA, William Renzo. Development and characterization of collagen films with added essential oil of clove india/Desenvolvimento e caracterização de filmes de colágeno com adição de óleo essencial de cravo-da-índia. **Journal of bioenergy and food science**, v. 3, n. 1, 2016.

NASCIMENTO, V. T. et al. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 3, p. 56-64, 2005.

NIMNI, M.E.; CHEUNG, D.; STRATES, B.; KODAMA, M.; SHEIKH, K. Chemically modified collagen: A natural biomaterial for tissue replacement. **J Biomed Mater Res**, 21: 741-771, 1987.

OLIVEIRA, Simone Helena dos Santos; SOARES, Maria Julia Guimarães Oliveira and ROCHA, Pascalle de Sousa. Uso de cobertura com colágeno e aloe vera no tratamento de ferida isquêmica: estudo de caso. **Rev. esc. enferm. USP**. 2010, vol.44, n.2, pp.346-351.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Vol. 18, Pp. 301-307, 2008.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A., CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. **Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis**. *Antimicrob Agents Chemoter*, 46(8): 2720–2722; 2002.

PEREZ-GAGO, M.B.; KROCHTA, J.M. Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 5, p. 705-710, 2001.

PINTO, Débora Cristina Sanches et al. Custo-efetividade do uso do curativo de colágeno e alginato no tratamento de áreas doadoras de enxerto de pele de espessura parcial. **Rev Bras Queimaduras**, v. 16, n. 2, p. 62-7, 2017.

PIRES, A. L. R. **Desenvolvimento de curativos flexíveis e neutralizados de quitosana e alginato contendo Alphasan® RC2000**. 2013. Tese de Doutorado. Dissertação de mestrado.

REMPEL, Lisienny CT et al. Incidência de infecções bacterianas em pacientes queimados sob tratamento em hospital universitário de Curitiba. **Rev Bras Queimaduras**, v. 10, n. 1, p. 3-9, 2011.

REZENDE NETO, José Melquíades. **Caracterização de membranas de colágeno modificado com extrato de frutos de Genipa americana L. e avaliação histomorfológica do efeito sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos**. 2011.

RODRIGUES, Robson. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Revista Análises Clínicas**, v. 1, n. 1, p. 21-32, 2017.

SAFAR, Laura Gentilini. **Controle de qualidade microbiológico de produtos farmacêuticos não estéreis**. 2012. 56 f. Monografia (Especialização) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Curso de Especialização em Microbiologia, Belo Horizonte, 2012.

SAMENTO, A. **Elaboração e caracterização de biofilmes a partir de gelatina reticulada**. Campinas, 1999. 149 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SANTOS JÚNIOR R. Q. et al. Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platonia insignis* Mart.). **ConScientiae Saúde**. 9(4): 575-581, 2010.

SCHLLEMER, Magalí. **Preparação e caracterização de biofilmes à base de manipueira para imobilização de caulinita intercalada com ureia**. 2013. 103 f. Tese - Curso de Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco.

SCHROOYEN, P.M.M.; DIJKSTRA, P.J.; OBERTHUR, R.C. Thermal and mechanical properties of films. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 221-230, 2001.

SHOJAEI, M. et al. Fabrication and characterization of ovalbumin films for wound dressing applications. *Materials Science and Engineering C*, v. 48, p. 158-164, 2015.

SILVA, Tatiane; PENNA, Ana. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. 2012, vol.71, n.3, p. 530-539.

SILVER, F; DOILLON, C. **Biocompatibility, interactions and implantable materials**. New York: VCR. 1989.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC; 2004

SOBRAL, P. J. A. Estado da arte da tecnologia de filmes comestíveis no Brasil. In. 4º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, p. 3, 2001.

SOUZA, Adriana Cunha. **PLATONIA INSIGNIS MART.: atividade antileishmania e antibacteriana do extrato etanólico e frações obtidas da casca do caule**. 2018.

STUCHI, Lídia A. Rossi et al. Cuidados locais com as feridas das queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 2, p. 54-59, 2010.

VALÉRIO, Erika da Silva et al. Avaliação da atividade dos extratos hidroetanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. e de *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume, frente a cepas de *Mycobacterium* sp. 2014.

VULCANI, V. A. S.; PLEPIS, A. M. de G. Ensaios de Liberação *in vitro* de progesterona a partir de matrizes de colágeno aniônico. **Vet. Not.** vol.12, n.2, ago-dez. 2006.

WILLIAM, D.F. **Definition in biomaterials**. New York: Elsevier, 1987.

WOLF, Kleber. **Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno**. 2007. 103 f. Tese – Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

YAACOB, O.; TINDALL, H. D. Mangoste encultivation. Rome: FAO, 1995. 100 p. **Plant Production and Protection Paper**, 129.

YAMAGUCHI, K. K. L. et al. Química e Farmacologia do Bacuri (*Platonia insignis*). **Scientia Amazonia**, v. 3, n.2, 39-46, 2014.

YANG, L.; PAULSON, A. T. Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. **Food Research Internacional**, Canada, v. 33, n. 7, p. 563-570, 2000.