



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

ELANNO PÁDUA ALBUQUERQUE DO NASCIMENTO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE BIOMEMBRANAS À BASE DE
GALACTOMANANA DA FAVA DANTA INCORPORADAS COM
CLOREXIDINA**

**PARNAÍBA-PI
MARÇO – 2017**

ELANNO PÁDUA ALBUQUERQUE DO NASCIMENTO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE BIOMEMBRANAS À BASE DE
GALACTOMANANA DA FAVA DANTA INCORPORADAS COM
CLOREXIDINA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.

Co-orientadora: Dra. Durcilene Alves da Silva.

Área de Concentração: Novas Tecnologias e Metodologias de Diagnóstico e Tratamento.

PARNAÍBA-PI
MARÇO – 2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

- N17a Nascimento, Elanno Pádua Albuquerque do.
Atividade antibacteriana de biomembranas à base de galactomanana da Fava Danta incorporadas com clorexidina [manuscrito] / Elanno Pádua Albuquerque do Nascimento. – 2017.
39 f. : il. color.
- Impresso por computador (printout).
Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2017.
Orientação: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.
Co-orientadora: Dra. Durcilene Alves da Silva
Área de concentração: Novas Tecnologias e Metodologias de Diagnóstico e Tratamento.
1. *Dimorphandra gardneriana*. 2. Galactomanana. 3. Clorexidina. 4. Reticulação. 5. Biomembranas. 6. Atividade Antibacteriana. I. Título.

CDD: 579.1

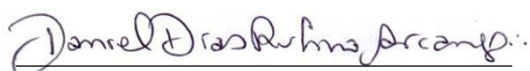
ELANNO PÁDUA ALBUQUERQUE DO NASCIMENTO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE BIOMEMBRANAS À BASE DE
GALACTOMANANA DA FAVA DANTA INCORPORADAS COM
CLOREXIDINA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

APROVADO EM 24/03/2017

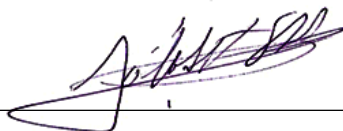
BANCA EXAMINADORA:



Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo/UFPI



Dr. Peter Eaton/UNIPORTO



Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite
Universidade de Brasília (UnB)
Orientador

PARNAÍBA-PI
MARÇO – 2017

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por me conceder a oportunidade de concluir mais uma etapa de crescimento pessoal e profissional.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (Biotec) por tornar viável a realização deste estudo, onde tive a oportunidade de iniciar minha vida como pesquisador, adquirindo grande aprendizado e fazendo grandes amizades.

Ao Laboratório de Polímeros (LabPol) da UFC pela colaboração nesta pesquisa, em especial à pessoa da professora Pablyana Cunha que gentilmente forneceu a galactomanana utilizada neste trabalho.

Ao prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite pela oportunidade orientação, pela competência e por ser fonte de inspiração como pesquisador.

À profa. Dra. Durcilene, pela oportunidade da co-orientação, pela confiança depositada na realização deste trabalho, pela amizade, paciência e pelos conhecimentos transmitidos ao longo desta caminhada.

Ao prof. Dr. Peter Eaton pela colaboração nas caracterizações por AFM.

À Alyne pela amizade, pela paciência, incentivo, conhecimentos transmitidos na microbiologia e por contribuir diretamente na construção deste trabalho. Sua ajuda foi inestimável, com certeza será uma excelente orientadora aos seus futuros alunos.

Ao Joi pela amizade, incentivo, pelas conversas edificantes e por tornar os momentos desta caminhada mais leves.

Ao Patrick pelos ensinamentos em microbiologia, pela amizade e pela inspiração à pesquisa.

Aos colegas do Biotec: João (pelo apoio no ensaio de liberação), Edmar, Nábila, Ayslan, Eryka, Jéssica Rodrigues (pelo auxílio inicial no planejamento do ensaio de liberação), Jéssica Teles, Jéssica Pires, David, Tayane (pelas caracterizações de FTIR e pelas estruturas poliméricas desenhadas), Sylvania, Carlinha, Raimunda, Yuri e a todos pelos momentos compartilhados.

Aos colegas de turma de mestrado pelos momentos compartilhados durante as disciplinas.

Aos meus pais, Antônio e Edilene, pelo cuidado e amor dispensados, pela dedicação e incentivo à minha educação.

À Marianne, pelo amor e carinho, paciência, auxílio e incentivo na conclusão desta etapa da minha vida. Companheira essencial nesta caminhada.

À minha família pelo incentivo a educação.

À Capes pelo apoio financeiro à realização desta pesquisa.

RESUMO

A confecção e utilização de biomembranas biodegradáveis a partir de polissacarídeos com a incorporação de fármacos ou moléculas bioativas tem despertado o interesse da indústria para confecção de curativos usados em feridas e suturas. Essas substâncias incorporadas podem desempenhar diretamente um papel de limpeza, ou indiretamente como antimicrobiano na prevenção/tratamento de infecções, a fim de obter melhores resultados terapêuticos quando comparados a curativos tradicionais passivos, tais como os curativos de gaze e algodão. Dentre esses polissacarídeos, as galactomananas destacam-se pela propriedade de formar filmes/membranas; contudo, os polissacarídeos apresentam-se hidrossolúveis e necessitam ter suas propriedades físicas melhoradas de acordo com sua aplicabilidade. Nesse sentido, reações de reticulação entre as cadeias poliméricas podem ser realizadas a fim de melhorar tais propriedades. Com o desafio atual de desenvolver novas matrizes biodegradáveis para a incorporação de ativos, este trabalho tem por objetivo a confecção de biomembranas de galactomanana extraída das sementes da *D. gardneriana* reticuladas com EDC e incorporadas com clorexidina para aplicação como curativos antimicrobianos. Foram desenvolvidas 04 tipos de biomembranas: uma biomembrana polissacarídica não reticulada, chamada de biomembrana controle (BC), uma biomembrana reticulada (BR) e biomembranas por duas rotas de reticulação e incorporação de clorexidina (R1 e R2). Caracterizações por FTIR demonstraram a presença de bandas entre 1560 e 1490 cm^{-1} , características de grupos funcionais da clorexidina nos espectros das biomembranas R1 e R2. A caracterização por TGA/DTG demonstrou melhor estabilidade térmica de BR e R2 em relação à BC. As biomembranas reticuladas (BR, R1 e R2) apresentaram insolubilidade por 24 horas quando imersas em água se comparadas a não reticulada (BC) que perdia sua integridade em meio aquoso. Além disso, foi realizada microscopia de força atômica para análise da morfologia das biomembranas e cálculo da rugosidade média que variou de 1,83 nm a 2,38 nm. As biomembranas incorporadas com clorexidina (R1 e R2) apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias do gênero *Estafilococos* (com diferentes perfis de susceptibilidade) e *Escherichia coli*.

Palavras-chave: *Dimorphandra gardneriana*, galactomanana, clorexidina, reticulação, biomembranas, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

The manufacture and use of biodegradable biomembranes from polysaccharides for an incorporation of bioactive drugs or molecules has aroused the industry interest in the manufacture of dressings used in wounds and sutures. These incorporated substances may play a cleaning role, or indirectly as an antimicrobial in the prevention/treatment of infections, in order to obtain better therapeutic results when compared to traditional passive dressings, such as gauze and cotton dressings. Among these polysaccharides, galactomannans stand out because of the property of forming films/membranes; however, the polysaccharides are water soluble and need to have their own better physical conditions according to their applicability. In order to this, crosslinked between polymer chains can be performed to improve such properties. With is the current developing challenge of new biodegradable matrices for an asset incorporation, this work objective to make biomembranes of galactomannan extracted from *D. gardneriana* seeds crosslinked with EDC and incorporated with chlorhexidine for application as antimicrobial dressings. Four types of biomembranes were developed: a non-crosslinked polysaccharide biomembrane, called a biomembrane control (BC), a reticulated biomembrane (BR) and biomembranes by two crosslinking way and incorporation of chlorhexidine (R1 and R2). Characterization by FTIR showed the presence of bands between 1560 and 1490 cm^{-1} , characteristics of functional groups of chlorhexidine in the spectra of biomembranes R1 and R2. The characterization by TGA/DTG demonstrated better thermal stability of BR and R2 in relation to BC. The crosslinked biomembranes (BR, R1 and R2) showed insolubility for 24 hours when immersed in water compared to uncrosslinked (BC) that lost its integrity in aqueous medium. In addition, an atomic force microscopy was performed to analyze the morphology of the biomembranes and to calculate the average roughness that varied from 1.83nm to 2.38nm. The biomembranes incorporated with chlorhexidine (R1 and R2) presented antimicrobial activity against bacteria of the genus *Staphylococcus* (with different susceptibility profiles) and *Escherichia coli*.

Keywords: *Dimorphandra gardneriana*, galactomannan, chlorhexidine, crosslinking, biomembranes, antibacterial activity.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMH - Ágar Muller Hinton

ANOVA - Análise da variância

TGA - Análise Termogravimétrica

CHX - Clorexidina

EDC - Hidroclorato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EPM - Erro Padrão da Média

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

AFM - Microscopia de Força Atômica

p - Nível de significância estatística

DTG - Termogravimetria Derivada

T_i - Temperatura inicial de decomposição

T_{max} - Temperatura máxima de decomposição

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

UV - Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Comprimentos de onda e grupos químicos presentes nas biomembranas.....	21
TABELA 2 - Parâmetros de estabilidade térmica das biomembranas BC, BR, R1 e R2.....	24
TABELA 3 - Rugosidade média (nm) das biomembranas BC, BR, R1 e R2.....	26
TABELA 4 - Área média de inibição dos halos (mm ²) e Erro Padrão da Média (EPM) no teste antibacteriano.....	31

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura química da galactomanana.....	5
FIGURA 2 - <i>Dimorphandra gardneriana</i>	6
FIGURA 3 - Estrutura química do digluconato de clorexidina.....	8
FIGURA 4 - Estrutura química do EDC.....	10
FIGURA 5 - Representação esquemática dos componentes do Microscópio de Força Atômica (AFM).....	14
FIGURA 6 - Esquema do teste de contato antibacteriano das biomembranas BR, R1, R2.....	15
FIGURA 7 - Aspecto físico da Biomembrana Controle (BC).....	17
FIGURA 8 - Mecanismo de reação da reticulação da galactomanana com EDC.....	19
FIGURA 9 - Aspecto físico da BR, R1, R2.....	20
FIGURA 10 - Espectro do FTIR da BR, R1, R2	22
FIGURA 11 - TGA e DTG da BC, BR, R1 e R2	23
FIGURA 12 - Imagens em 3D (5 µm x 5 µm) de AFM da BC, BR, R1 e R2.....	26
FIGURA 13 - Rugosidade média (nm) das biomembranas. BC, BR, R1 e R2.....	27
FIGURA 14 - Teste antibacteriano contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 (MRSA- “Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ”), <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 e <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	29
FIGURA 15 - Área dos halos inibitórios das biomembranas BR, R1 e R2 em cada bactéria testada.	31

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Infecções de Feridas	3
2.2 Galactomananas	4
2.2.1 Galactomanana da Fava Danta	6
2.3 Clorexidina	7
2.4 Biomembranas Antibacterianas e o uso de Reticulante	9
3 OBJETIVOS	11
3.1 Geral.....	11
3.2 Específicos	11
4 MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Confeção das Biomembranas de Galactomanana.....	12
4.1.1 Materiais e reagentes.....	12
4.1.2 Extração da galactomanana da <i>D. gardneriana</i>	12
4.1.3 Confeção das biomembranas	12
4.2 Caracterização das Biomembranas de Galactomanana	13
4.2.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	13
4.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria Derivada (DTG).....	13
4.2.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)	13
4.3 Teste Antibacteriano	15
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1 Confeção das Biomembranas de Galactomanana.....	17
5.2 Caracterização das Biomembranas de Galactomanana	20
5.2.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier- FTIR	20
5.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria Derivada (DTG).....	22
5.2.3 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	25

5.3 Teste antibacteriano.....	28
6 CONCLUSÃO	33
7 PERSPECTIVAS	34
Referências.....	35

1 INTRODUÇÃO

Mesmo com o moderno arsenal na tecnologia médica, a infecção ainda é um grande desafio para o eficaz tratamento de feridas. O exsudato da região ferida propicia um ambiente favorável ao desenvolvimento e proliferação de micro-organismos (TUMMALAPALLI et al., 2015; TWUM-DANSO et al., 1992). Dentre esses patógenos, as bactérias do gênero *Estafilococos* são comumente responsáveis por infecções de pele, especialmente em infecções no local cirúrgico (MUSCHER et al., 1994; SADER; FLAMM; JONES, 2013). Além dos *Estafilococos*, *Streptococos beta-hemolíticos* e *Pseudomonas aeruginosa* são citados como principais responsáveis por infecções agudas e crônicas, e cicatrização retardada de feridas (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001).

A grande variedade de tipos de feridas propiciou a introdução de novos curativos a fim de melhorar diferentes aspectos no processo de cicatrização de ferimentos. O curativo ideal deve proporcionar cura rápida, ser de custo mínimo e causar o mínimo de inconveniente para o paciente (BOATENG et al., 2008).

Os curativos são utilizados tradicionalmente para proteger a ferida de contaminações, porém podem ganhar novas funcionalidades quando são utilizados para liberação de moléculas bioativas/fármacos naquele local, a fim de obter melhores resultados terapêuticos onde curativos em formas tradicionais passivas não o teriam como é o caso de curativos de gaze e algodão (BOATENG; CATANZANO, 2015).

Os fármacos incorporados nos curativos podem desempenhar diretamente um papel de limpeza de tecido necrótico ou indiretamente como antimicrobianos na prevenção/tratamento de infecções, ou até mesmo como fatores de crescimento, auxiliando a regeneração de tecidos. Dessa forma, estes curativos são potencialmente úteis para tratamento de infecções locais, obtendo-se uma concentração eficaz da droga localmente e evitando a administração de doses sistêmicas superiores ao que é necessário para aquela região (BOATENG; CATANZANO, 2015).

Dentre os fármacos que já são utilizados em desinfecção cutânea pré-operatória tópica, queimaduras e feridas em pele está a clorexidina, um antimicrobiano bisguanidina ativo contra grande número de bactérias, fungos e vírus (HIDALGO; DOMINGUEZ, 2001). Nesse contexto, a clorexidina tem sido proposta para incorporação em matrizes poliméricas e desenvolvimento de curativos antibacterianos (AGARWAL et al., 2012; KIM et al., 2015).

A confecção e utilização de revestimentos biodegradáveis a partir de polímeros naturais como proteínas, polissacarídeos, lipídios ou combinações destes tem despertado

interesse na indústria farmacêutica para a síntese de curativos destinados a sutura (FIGUERÓ et al., 2004). Dentre esses polissacarídeos, as galactomananas se destacam pela propriedade de formar filmes/membranas (CERQUEIRA et al., 2011).

As galactomananas são obtidas principalmente a partir de endospermas de sementes de leguminosas (PRAJAPATI et al., 2013), sendo constituídas basicamente de uma cadeia principal de unidades D-manose e ramos simples de D-galactose ligados a ela (KOK; HILL; MITCHELL, 1999; SCHERBUKHIN; ANULOV, 1999). São polímeros hidrofílicos, biodegradáveis, atóxicos, baratos (JIAN et al., 2012) e que apresentam alta viscosidade quando em meio aquoso (ALMEIDA et al., 2015).

Dentre as galactomananas destaca-se a obtida a partir da semente de *Dimorphandra Gardneriana*, conhecida popularmente com Fava Danta, planta que é bastante utilizada por suas propriedades comercialmente úteis na indústria biomédica e farmacêutica pela extração de flavonoides (CUNHA et al., 2009). Estudos já descrevem a modificação química da galactomanana de *D. Gardneriana* (MOURA NETO et al., 2014) e produção de sistemas para liberação controlada de bioativos (ALMEIDA et al., 2015). Porém, ainda não há nenhum estudo que relate a utilização dessa goma de galactomanana na confecção de biomembranas com propriedade antibacteriana.

Com o desafio atual de desenvolver novas matrizes biodegradáveis para a incorporação de ativos, neste trabalho apresenta-se a confecção de biomembranas de galactomanana da *D. Gardneriana* incorporadas com clorexidina para aplicação como curativos antimicrobianos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Infecções de Feridas

A pele é o maior órgão do corpo e funciona como uma barreira física à invasão de micro-organismos. Naturalmente é colonizada por uma microbiota composta por uma variedade de estafilococos, corinebactérias, propionibactérias e leveduras, e a ruptura de sua integridade pode propiciar colonização e infecção desse tecido (DRYDEN, 2009).

A etiologia das feridas pode ser aguda ou crônica. Feridas agudas caracterizam-se por danos externos à pele intacta como no caso de incisões cirúrgicas, queimaduras, cortes e abrasões. Já as feridas crônicas possuem a característica de cicatrizarem lentamente e geralmente estão associadas a doenças metabólicas, traumatismos repetidos, infecção persistente e/ou tratamento primário deficiente (DAVIS et al., 1992).

Grande parte das feridas abertas encontram-se contaminadas por micro-organismos, porém não necessariamente demonstram evidência de infecção e resposta imunitária do hospedeiro. O *Staphylococcus aureus* e estreptococos β -hemolíticos são responsáveis pela maioria das infecções cutâneas (DRYDEN, 2009), mas também a *Pseudomonas aeruginosa* e algumas espécies de Proteus, Clostridium e Coliformes estão comumente associadas a infecção de feridas e consequente cicatrização retardada (BOATENG; CATANZANO, 2015; BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001; TWUM-DANSO et al., 1992),

A invasão da superfície viável da ferida por patógenos pode provocar reações locais e sistêmicas como: secreção purulenta, eritema espumoso doloroso ou celulite sintomática, levando em última instância à septicemia (BOATENG; CATANZANO, 2015). Dessa maneira, os cuidados gerais envolvidos no tratamento envolvem o controle de fatores sistêmicos como a dor e níveis séricos de glicose, em caso de pacientes diabéticos, associado ao tratamento local da ferida, evitando a colonização inicial ou o combate à infecção já instalada naquela região (CAVANAGH et al., 2010).

Nesse intuito, plataformas antimicrobianas confeccionadas a partir de polímeros naturais carreando fármacos (JANA et al., 2016) ou compostos naturais bioativos têm ganhado destaque (ANJUM et al., 2016; TUMMALAPALLI et al., 2015). Entre esses fármacos, a clorexidina é um forte candidato para incorporação em curativos (ECHAGUE; HAIR; CUNNION, 2010), apresentando atividade antimicrobiana contra diversos tipos de bactérias e fungos (AGARWAL et al., 2012; ECHAGUE; HAIR; CUNNION, 2010).

Dentre os polímeros naturais utilizados na confecção de filmes/membranas, os polissacarídeos: amido, celulose, quitosana, pectina, carragenana, ágar e gomas podem ser citados (DHANAPAL et al., 2012).

2.2 Galactomananas

Galactomananas são heteropolissacarídeos neutros extraídos principalmente de endospermas de sementes de plantas da família Leguminosae, onde possuem função de defesa, retenção de água e armazenamento (SCHERBUKHIN; ANULOV, 1999). Esses polissacarídeos também podem ser extraídos de outras famílias de plantas como a Palmae, Annonaceae, Convolvulaceae, Ebenaceae e Loganiaceae, e de algumas espécies de fungos (PRAJAPATI et al., 2013).

Os quatro principais grupos de galactomananas de sementes são obtidos de goma alfarroba (*Ceratonia siliqua*), goma guar (*Cyamopsis tetragonoloba*), goma tara (*Caesalpinia spinosa* Kuntze) e feno-grego (*Trigonella foenum-graecum* L.). Dessas, apenas goma guar e alfarroba são de considerável importância comercial. O uso das outras duas é limitado devido à disponibilidade e preço (PRAJAPATI et al., 2013).

Frequentemente o mercado internacional demanda a introdução de novas fontes de gomas de sementes; dessa forma, fontes alternativas de galactomananas são importantes como alternativas renováveis a essas gomas tradicionais (CERQUEIRA et al., 2009). Apesar da rica biodiversidade da flora local e do clima favorável para a produção de espécies nativas, as galactomananas oriundas de regiões latino-americanas são pouco utilizadas comercialmente (CERQUEIRA et al., 2009). Como agravante, o Brasil importa cada vez mais polissacarídeos, gerando um gasto superior em relação à exportação. Só no ano de 2013 o custo com importação de goma guar e alfarroba superou 60 milhões de reais, perfazendo quase 4.000 toneladas de goma (SALVALAGGIO, 2010; SAVI JUNIOR, 2014).

Tendo em vista a grande diversidade de espécies vegetais para a extração de gomas de sementes no Brasil, essa poderia ser uma alternativa para suprir demanda de importação de polissacarídeos pelo país (MONTEIRO, 2009).

As galactomananas são polímeros com muitas aplicações e diferentes propriedades físico-químicas, sendo bem utilizadas como espessantes em sistemas aquosos simples e estabilizantes de emulsões. São considerados recursos renováveis e atóxicos, favorecendo seu amplo uso nas indústrias têxteis, farmacêuticas, biomédicas, cosméticas e alimentícias. (SALVALAGGIO et al., 2015). Quanto a sua toxicidade, estudos *in vivo* com galactomananas extraídas de sementes de *Leucaena leucocephala* (leucena), *Cyamopsis tetragonolobus* (goma guar) e *Dimorphandra*

mollis demonstraram ausência de citotoxicidade (PANEGASSI; SERRA; BUCKERIDGE, 2000).

As galactomananas são compostas de um esqueleto de unidades repetidas beta D-manopiranosil ligadas entre si por pontes de oxigênio 1-4 e possui unidades alfa D-galactopiranosil ligadas à cadeia principal por pontes de oxigênio 1-6 (Figura 1) (SALVALAGGIO et al., 2015; AZERO; ANDRADE, 1999).

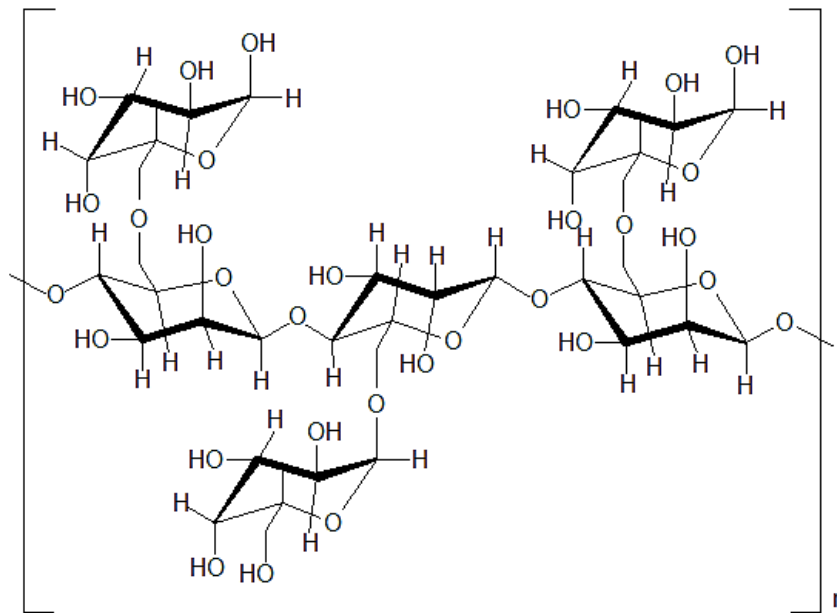


Figura 1- Estrutura química da Galactomanana.

Embora a estrutura básica das galactomananas extraídas seja a mesma em diferentes espécies de vegetais, há variação entre elas no peso molecular, na razão manose/galactose, e na distribuição dos ramos laterais de galactose ao longo da espinha dorsal de manose. Estas variações influenciam na solubilidade, propriedades reológicas e estabilidade térmica da goma (LIYANAGE et al., 2015). As razões manose/galactose podem variar de 1:1,0–1,1 para fenogrego, 1:1,6–1,8 para goma guar, 1:3,0 para goma tara e 1:3,9–4,0 para alfarroba (PRAJAPATI et al., 2013).

As galactomananas são solúveis em água e formam fluidos viscosos e estáveis. O grau de solubilidade em água depende da quantidade galactose substituinte, onde uma maior quantidade de galactose resulta numa solubilidade reduzida (MONTEIRO, 2009). A massa molar também influencia diretamente na viscosidade em solução (CERQUEIRA et al., 2011). Além disso, esse polímero pode interagir sinergicamente com outros polissacarídeos como ágar, goma xantana e carragenana para a formação de géis (MONTEIRO, 2009).

2.2.1 Galactomanana da Fava Danta

As sementes de plantas de leguminosas são uma das principais fontes de galactomananas, entre esses vegetais destaca-se a espécie *Dimorphandra gardneriana* Tul (Figura 2) popularmente conhecida como fava danta, faveira, favela barba-timão, barbatimão sucupira, barbatimão de folha-miúda e fava-de-arara, que são de grande interesse para indústria farmacêutica como fontes de flavonoides (PRAJAPATI et al., 2013; RIBEIRO-SILVA; SCARIOT; MEDEIROS, 2012), sendo típica do cerrado brasileiro nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará e Bahia (MONTEIRO, 2009).

As faveiras possuem porte médio, atingindo até 20 metros de altura, contudo geralmente possuem menos que isso. O fruto é um legume achatado com aspecto variando de verde (quando imaturo), amarelado (quando em amadurecimento) e marrom-escuro a quase negro quando totalmente maduro. Além disso, possui odor forte e adocicado contendo uma média de 15 sementes. A Fava Danta é utilizada pelos extrativistas na sua alimentação e na medicina popular, e como recursos alimentares para a fauna local (FILIZOLA, 2013).



Figura 2- *Dimorphandra gardneriana*. A (árvore), B e C (frutos).

Fonte: Filizola (2013).

Na medicina popular, os frutos da fava danta são usados para tratamento de diversas enfermidades. A infusão do fruto verde é utilizada para conter hemorragias e tratar hemorróidas, varizes e hematomas. Com a entrecasca curtida em água fria produz-se chá usado externamente como cicatrizante (FILIZOLA, 2013).

Os seus frutos são comercialmente muito úteis, sendo explorados para obtenção de rutina e quercetina, ambos flavonoides com diversas propriedades farmacológicas antiinflamatórias, antioxidantes, vasoprotetoras e antitumorais (LANDIM; COSTA, 2012).

Através do processo de extração das sementes maduras de *D. gardneriana* obtém-se facilmente uma goma de galactomanana, com rendimento de aproximadamente de 31% em relação às sementes. Posteriormente, a purificação pode ser realizada a fim de remover proteínas e outros contaminantes, onde o rendimento pode chegar a 80% (CUNHA et al., 2009).

Nessa goma a razão manose/galactose é de 1,84, e sua massa molar é de $3,9 \times 10^7$ g/mol. Além desses dois monossacarídeos citados, que compõem majoritariamente essa goma, também é encontrada uma pequena quantidade de glicose (1,1%), ácido urônico (2,8%) e proteínas (1,75%)(CUNHA et al., 2009).

A goma de galactomanana da *D. gardneriana* forma um fluido pseudoplástico quando em solução de 1%, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento e depois vai retomando sua estrutura quando a taxa de cisalhamento volta a zero. Quando em solução abaixo de 1% a pseudoplasticidade diminui, tendendo a um comportamento newtoniano em concentrações de 0,5 e 0,3%. Já a uma concentração de 0,1% pode-se observar um comportamento essencialmente newtoniano, onde a taxa de cisalhamento não afeta na viscosidade desse líquido (MONTEIRO, 2009; CUNHA et al., 2009).

A sua capacidade de formar geis tem ganhado destaque no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de drogas (ALMEIDA et al., 2015) devido suas propriedades de viscosidade e da facilidade de preparo a partir de soluções em água.

2.3 Clorexidina

A clorexidina (CHX) é um fármaco que apresenta em sua estrutura dois grupos bisguanida e dois anéis clorofenólicos ligados entre si por cadeias de hexametileno (Figura 3).

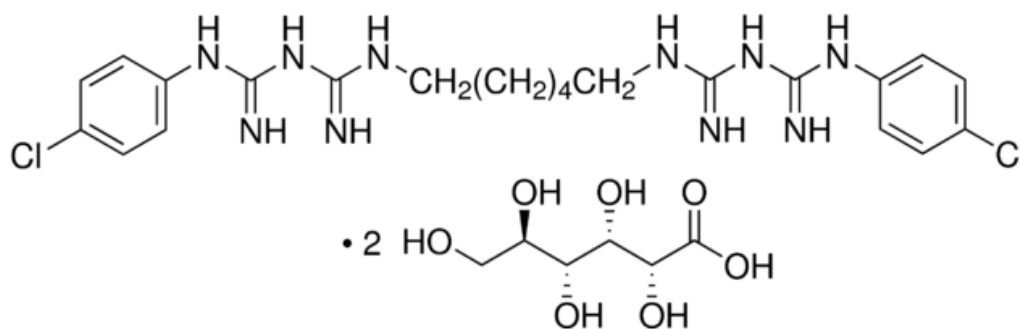


Figura 3- Estrutura química do digluconato de clorexidina.

A bisguanida tem caráter fortemente básico e é carregada positivamente, o que torna a clorexidina insolúvel em água; por conseguinte, formulações em forma de sal de digluconato de clorexidina permitem sua solubilidade em água e promovem a dissociação de suas moléculas catiônicas em pH fisiológico (CUOZZO, 2013).

A clorexidina possui carga dicatiônica e tem seu mecanismo de ação interagindo eletrostaticamente com os fosfolipídios da membrana celular aniônica da bactéria, alterando-a estruturalmente, com consequente aumento de sua permeabilidade. Dessa forma, o fármaco adentra para o meio intracelular, causando perda do equilíbrio osmótico, promovendo extravasamento do conteúdo celular e posterior morte da bactéria (COSTALONGA et al., 2012; HUGO; LONGWORTH, 1964).

A CHX é um excelente antimicrobiano candidato à incorporação em curativos para feridas. Citado como padrão ouro, ela é ativa contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias facultativas, vírus e fungos (AGARWAL et al., 2012; ECHAGUE; HAIR; CUNNION, 2010) apresentando efeito bactericida imediato e um ótimo efeito residual, impossibilitando a recolonização de micro-organismos quando usada na pele (AGARWAL et al., 2012; WU et al., 2008).

Entretanto, a toxicidade da clorexidina é apontada como uma desvantagem quando da sua aplicação direta em tratamentos de longa duração de feridas (AMBROGI et al., 2016). Assim o desenvolvimento de plataformas contendo a CHX, que possam libertar o fármaco em doses necessárias mínimas para prevenção/tratamento de infecções em feridas é bem válido.

Um estudo de avaliação de citotoxicidade *in vitro* em células dermais humanas demonstrou ser citotóxica mesmo em concentrações abaixo das usualmente utilizadas na prática clínica, de 0,5% para feridas em pele e 0,12% em soluções de uso oral (HIDALGO; DOMINGUEZ, 2001).

Em contrapartida, membranas de quitosana incorporadas com clorexidina a 1% não apresentaram citotoxicidade contra células dermais humanas, já quando incorporadas com clorexidina a 5% apontaram tal citotoxicidade. Vale ressaltar que a quitosana neste estudo foi dissolvida em ácido acético e isso pode ter contribuído para o efeito citotóxico (AMBROGI et al., 2016). Outro estudo publicado por Daud et al. (2016) mostrou que CHX a 5% imobilizada em discos de aço apresentou cerca de 80% viabilidade celular para fibroblastos da pele humana.

Estudos demonstram que até mesmo uma solução de 0,002% do fármaco para aplicação em feridas de pele apresenta mínima citotoxicidade podendo ser capaz de suprimir a divisão celular, afetando diretamente na síntese proteica, apesar de ser considerado um antimicrobiano de uso seguro (PUCHER; DANIEL, 1992; OLIVEIRA, 2004).

Hidalgo e Domiguez (2001) em seu estudo *in vitro* de viabilidade celular em fibroblastos dérmicos humanos primários demonstraram que a CHX em concentração de 0,001% provocaram a diminuição da viabilidade após um período de 24 h de incubação, enquanto que uma solução a 0,0025% resultou em morte celular total.

Nesse sentido também pode ser bem distinta a quantidade do fármaco liberado da plataforma confeccionada, influenciando diretamente na citotoxicidade, onde mesmo biomateriais com maiores quantidades de CHX incorporadas podem liberar, por hora, menores quantidades do que outros com menores concentrações do ativo (AGARWAL et al., 2012). Sendo assim, torna-se difícil relatar precisamente qual a dose tóxica para uso direto na pele, haja vista que o modelo de teste de toxicidade pode não mimetizar a situação de uso rotineiro da droga, pois nesse caso a CHX entra em contato íntimo com as células em teste, e a mínima quantidade aplicada pode ser tóxica e causar morte celular ou diminuição de suas funções vitais.

2.4 Biomembranas Antibacterianas e o uso de Reticulante

O uso de curativos antimicrobianos tradicionais tem se tornado uma rotina no tratamento de ferimentos, porém uma das grandes limitações é que este tipo curativo adere em contato com a ferida, dificultando sua troca diariamente (BOATENG et al., 2008)

O desenvolvimento de curativos biodegradáveis antimicrobianos pode ser uma alternativa nesse sentido, pois além de realizarem a proteção mecânica e evitarem/combaterem uma infecção já instalada podem ser não aderentes (BOATENG et al., 2008).

A confecção membranas/filmes a base de polímeros naturais e sintéticos como plataforma antimicrobiana já tem sido demonstrada a partir de proteína soja (EGOZI et al., 2015), ácido poliglicólico e poliglicolato (ELSNER; SHEFY-PELEG; ZILBERMAN, 2010), gelatina (SIQUEIRA et al., 2015), colágeno (CHOI et al., 2016), alginato (ALBOOFETILEH et al., 2014), quitosana (ALTIOK; ALTIOK; TIHMINLIOGLU, 2010; AMBROGI et al., 2016), amido (ABREU et al., 2015), celulose (GOUVÊA; MENDONÇA; SOTO, 2015) goma guar (DAS et al., 2011; JANA et al., 2016), entre outros.

Contudo, os polissacarídeos apresentam-se hidrossolúveis; e, assim, necessitam ter suas propriedades físicas melhoradas de acordo com sua aplicabilidade (SIQUEIRA et al., 2015). Nesse sentido, reações cruzadas entre as cadeias poliméricas, também chamadas de reticulações, podem ser realizadas a fim de melhorar tais propriedades (JANA et al., 2016).

Reticulantes são produtos de baixa massa molecular, que apresentam pelo menos um grupo funcional reativo capaz de promover reações inter ou intra cadeias poliméricas. De

acordo com o tipo de reticulante as ligações cruzadas ocorrem de forma covalente ou iônica (BERGER et al., 2004).

Dentre os agentes reticulantes, o hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida - EDC (Figura 4) é citado como agente de ligações cruzadas covalentes em filmes confeccionados de polissacarídeos (LEE; CHEN; TSAO, 2010) e em proteínas (VULPE et al., 2016). Ele tradicionalmente promove ligações entre grupamentos carboxílicos e grupamentos amina (NAM et al., 2010); no entanto, também promove ligações cruzadas entre grupamentos hidroxilas de polissacarídeos (BANEGAS et al., 2013).

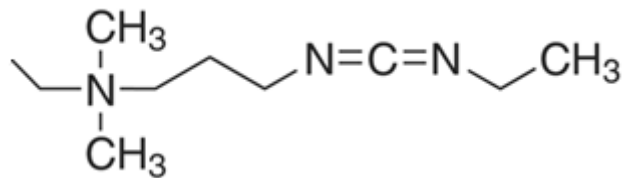


Figura 4- Estrutura química do hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).

O uso do EDC para reticulação de filmes de galactomananas da Goma Guar demonstrou ser vantajoso em relação a reticulantes tradicionais como glutaraldeído e formaldeído, apresentando baixa toxicidade, onde os subprodutos da reação (derivados da uréia) podem ser facilmente removidos com lavagem em água da biomembrana confeccionada (BANEGAS et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Confeccionar biomembranas antibacterianas utilizando galactomanana de sementes de *Dimorphandra gardneriana* incorporadas com clorexidina.

3.2 Específicos

- Verificar a possibilidade da galactomanana de sementes de *D. gardneriana* em formar biomembranas;
- Produzir biomembranas por meio de duas rotas de incorporação de clorexidina e reticulação;
- Caracterizar as biomembranas desenvolvidas por meio de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Análise Termogravimétrica (TGA) e Microscopia de Força Atômica (AFM);
- Avaliar a efetividade da atividade antimicrobiana das biomembranas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Confeção das Biomembranas de Galactomanana

4.1.1 Materiais e reagentes

O hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) foi obtido a partir da Sigma-Aldrich, o etanol foi adquirido da Dinâmica Química Contemporânea Ltda. e a Clorexidina (CHX) obtida da Lanza Pharma Ltda/Brasil. A galactomanana da *D. gardneriana* foi extraída segundo o método de Cunha et al. (2009).

4.1.2 Extração da galactomanana da *D. gardneriana*

Sementes maduras de *D. gardneriana* pesando 20 g foram imersas em 100 mL de água fervente durante 20 min e armazenadas durante 24 h à temperatura ambiente (~28 °C). Em seguida as sementes foram descascadas manualmente, separando o endosperma da casca e embrião. Posteriormente os endospermas foram colocados em 100 mL de água quente (75 °C) por mais 2 horas para completar o intumescimento. Para melhorar a homogeneização adicionou-se mais água e a mistura foi processada em liquidificador. A solução viscosa obtida foi centrifugada a 6000 rpm durante 30 minutos e o sobrenadante removido e precipitado com o dobro do seu volume de etanol a 95% (v/v). O precipitado foi recolhido num filtro de vidro (grau fino), lavado sucessivamente com etanol e acetona, seco com ar quente e pesado. A amostra assim obtida é chamada de galactomanana da Fava Danta (CUNHA et al., 2009).

4.1.3 Confeção das biomembranas

A técnica utilizada para confeção das biomembranas foi a de evaporação de solvente (“*casting*”). Nessa técnica o polímero é disperso em solvente apropriado, formando um sistema viscoso, e então vertido sobre uma superfície não adesiva (suporte). Posteriormente é levado para secar a estufa e a membrana seca é removida do suporte (SANTOS, 2012).

A priori, foi confeccionada uma biomembrana controle (BC) a partir de uma solução a 1% de galactomanana em água ultrapura sob agitação por 24 horas em temperatura ambiente. Em seguida, a solução de galactomanana foi vertida sobre placa de Petri de poliestireno estéril de 8,5 centímetros de diâmetro e levada para secar em estufa sem fluxo de ar por 16 horas a 40°C.

A partir da BC obtida, confeccionou-se biomembranas reticuladas incorporadas com clorexidina. Para tanto, foram utilizadas 02 rotas distintas de confeção dessas biomembranas. Na primeira rota, uma solução de etanol/água (40%/60%) (v/v), contendo 5% de EDC e 1% de CHX é preparada, na qual a biomembrana controle foi imersa, deixando-se reagir por 24 horas

em temperatura ambiente. Em seguida, a biomembrana foi lavada em água ultrapura para remoção do EDC não reagente, e posteriormente colocada para secar em estufa a 40°C por 240 minutos. Ao final a biomembrana é chamada de R1.

Na segunda rota, uma solução de etanol/água (40%/60%) (v/v) contendo 5% de EDC é preparada, na qual a biomembrana foi imersa por 24 horas a temperatura ambiente. Completado o tempo de reação, a mesma foi lavada com água ultrapura e seca em estufa a 40°C por 240 minutos. Em seguida é imersa em solução 1% de CHX por 24 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi removida da placa de Petri e a biomembrana lavada em água ultrapura e seca em estufa a 40°C por 210 minutos. Assim, a biomembrana obtida é chamada de R2.

Também foi confeccionada uma biomembrana reticulada (BR) sem a incorporação de clorexidina. A BR foi desenvolvida a partir da imersão da BC em solução de solução de etanol/água (40%/60%) (v/v) contendo 5% de EDC por 24 horas, seguida de lavagem em água ultrapura e secagem em estufa a 40°C por 240 minutos.

4.2 Caracterização das Biomembranas de Galactomanana

4.2.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os grupos funcionais presentes nas biomembranas confeccionadas foram detectados por meio por espectrofotômetro FTIR IRAffinity-1S (SHIMADZU), usando modo de transmissão e faixa de leitura espectral de 4000 a 700 cm^{-1} .

4.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria Derivada (DTG)

O estudo do TGA e DTG permite analisar a estabilidade térmica das biomembranas BC, BR, R1 e R2 desenvolvidas. A análise foi realizada em equipamento da TA Instruments, modelo Q50, localizado no Laboratório de Polímeros (LabPol) da Universidade Federal do Ceará, com fluxo de ar sintético de 60 mL/min e taxa de aquecimento de 10°C/min, com varredura no intervalo de temperatura entre 25 e 800°C.

4.2.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A morfologia superficial e a rugosidade das biomembranas de galactomanana desenvolvidas (BC, BR, R1 e R2) foram analisadas por Microscópio de Força Atômica, modelo TT-AFM (AFM Workshop, USA), localizado no Laboratório de Nanobiotecnologia do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – BIOTEC. O microscópio é constituído basicamente de uma sonda presa a uma extremidade de uma “alavanca” (*cantilever*), um

sistema de detecção, um *scanner* e um sistema de controle (*software e hardware*) (EATON; WEST, 2010), como pode ser observado na Figura 5.

O equipamento foi utilizado em modo intermitente, onde áreas representativas de 5 μm x 5 μm foram analisadas com auxílio de uma sonda ACT-20 (AppNano - USA), com frequência de ressonância em, aproximadamente, 350 kHz. As imagens obtidas de 512 x 512 pixel foram examinadas no programa Gwyddion 2.47 e a rugosidade média foi calculada a partir de múltiplas áreas (n=15) de 1 μm x 1 μm . Além disso, o experimento foi conduzido em temperatura ambiente.

Os resultados de rugosidade foram expressos como Média \pm EPM. Para a comparação entre as médias de rugosidade das biomembranas foi realizado teste ANOVA com *Post Hoc* de Tukey, onde $p < 0,05$ foi estabelecido para as diferenças estatisticamente significativas. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism® 6.0.

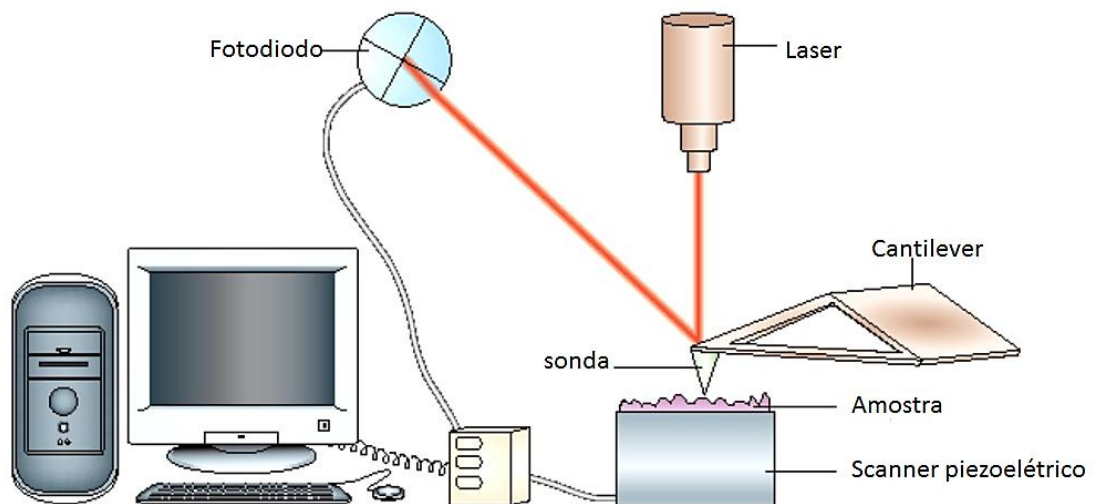


Figura 5 - Representação esquemática dos componentes do Microscópio de Força Atômica (AFM). Adaptado de <http://www.geobacter.org>.

4.3 Teste Antibacteriano

A avaliação da atividade antibacteriana das biomembranas foi realizada por meio do teste de contato em Ágar Mueller Hinton (AMH). Para o teste, foram utilizadas estirpes Gram-positivas: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA - “Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*”) e Gram-negativa: *Escherichia coli* ATCC 25922.

As bactérias foram previamente semeadas em AMH e incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, em condições aeróbicas, para obtenção de colônias isoladas na fase de crescimento logarítmico (18-24 h). As colônias isoladas foram inoculadas em solução salina estéril (0,85%) para confecção de uma solução padronizada em 0,5 da escala de McFarland, ou seja, com absorbância dentro do intervalo de 0,08-0,1 após leitura a 625 nm em UV-vis (UV-1800, SHIMADZU), que equivale a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL.

A partir do inóculo foi realizado o semeio bacteriano em AMH com auxílio de *swab* estéril. Em seguida as biomembranas (BR, R1 e R2) de formato circular com 8 mm de diâmetro foram cortadas com auxílio de um *punch* cirúrgico e colocadas sob luz ultravioleta por 60 minutos a fim de sucumbir microrganismos viáveis na superfície das membranas. Estas, por sua vez, foram depositadas sobre o ágar conforme o esquema da Figura 6, e as placas incubadas por 24 horas sob as mesmas condições citadas anteriormente.

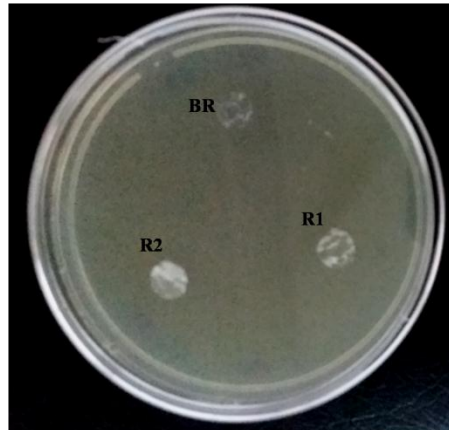


Figura 6 - Esquema do teste de contato antibacteriano com biomembranas BR, R1, R2.

A visualização do resultado baseou-se na ausência de crescimento bacteriano sob a biomembrana e/ou formação de zona de inibição de crescimento bacteriano ao redor da mesma após o período de incubação. A área média de inibição do crescimento bacteriano foi calculada por meio do *software* ImageJ a partir das zonas de inibição observadas. Em seguida foi realizado teste de comparação das médias das áreas de inibição para cada biomembrana utilizada contra

as bactérias supracitadas utilizando a análise de variância (ANOVA), erro padrão da média (RPM) e nível de significância de 5% com auxílio o *software* GraphPad Prism® 6.0. O experimento foi conduzido em triplicata, sob condições assépticas e de acordo com as normas da Clinical & Laboratory Standards Institute - CLSI (2012) com adaptações.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Confeção das Biomembranas de Galactomanana

Tendo em vista que gomas de galactomananas de outras leguminosas já tem sido relatadas por apresentarem a propriedade formar filmes, e por não existirem relatos na literatura sobre a confecção de filmes/membranas de galactomananas de *D. gardneriana*, seguiu-se pela tentativa de verificar se a partir da goma das sementes da referida planta seria possível confeccionar esse tipo de biomaterial. Dessa forma, inicialmente foi confeccionada a Biomembrana Controle (BC) pela técnica de *casting*, a partir de uma solução a 1% de galactomanana em água ultrapura.

A BC obtida apresentou-se homogênea, incolor e transparente, fina, flexível e que foi facilmente removida da placa de Petri onde foi confeccionada (Figura 7). Porém a Biomembrana controle é solúvel em água e perde sua integridade quando em meio aquoso. Filmes de goma guar e quitosana confeccionados para aplicações na indústria alimentícia também apresentaram características semelhantes (RAO et al., 2010).

Por serem hidrofílicas, membranas à base de polissacarídeos sofrem absorção de água na sua superfície, ocorrendo interações das moléculas de água com grupos polares da biomembrana resultando em tumefação e mudanças conformacionais em sua estrutura (RAO et al., 2010). Nesse contexto, o uso de galactomananas para confecção de biomateriais pode ser limitado devido a essa solubilidade em meio aquoso, influenciando nas propriedades mecânicas finais do biomaterial fabricado (SIQUEIRA et al, 2015).



Figura 7- Aspecto físico da biomembrana de galactomanana.

Tendo em vista que a proposição deste trabalho é a confecção de biomembranas incorporadas com clorexidina, e que assim possam ser lançadas como potenciais plataformas antimicrobianas, é desejável que as mesmas não se desintegram rapidamente, levando ao extravasamento total do fármaco em meio aquoso. A fim de melhorar esta propriedade, a biomembrana controle (BC) foi submetida ao processo de reticulação com EDC. Nesse processo a BC é imersa em solução de EDC a 5% em etanol/água (40%/60%). O uso de álcool em solução de EDC objetiva evitar seu processo de hidrólise, onde a concentração de 40% de etanol propicia melhor eficiência de reticulação (LEE; CHEN; TSAO, 2010).

O mecanismo pelo qual ocorrem as ligações cruzadas é demonstrado na Figura 8. Nessa reação, inicialmente o EDC sofre um ataque nucleofílico pelos grupamentos O-H da galactomanana (Figura 8a), nesse ínterim forma-se um pré-derivado da ureia como composto intermediário. Por conseguinte, ocorre um segundo ataque nucleofílico de grupos O-H sobre o carbono eletrofílico desse composto intermediário (Figura 8b), promovendo a formação de ligações glicosídicas no polissacarídeo (Figura 8c) e a liberação um derivado da ureia como subproduto da reação (Figura 8d) que pode ser removido por meio da lavagem da biomembrana em água. Por esse processo a quantidade de grupos hidroxila no polissacarídeo reduz, diminuindo a solubilidade (BANEGAS et al., 2013). Ao final, a biomembrana reticulada (BR) não sofre dissolução em menos de 24 horas quando imersa em água, apresentando-se incolor, transparente e flexível (Figura 9A).

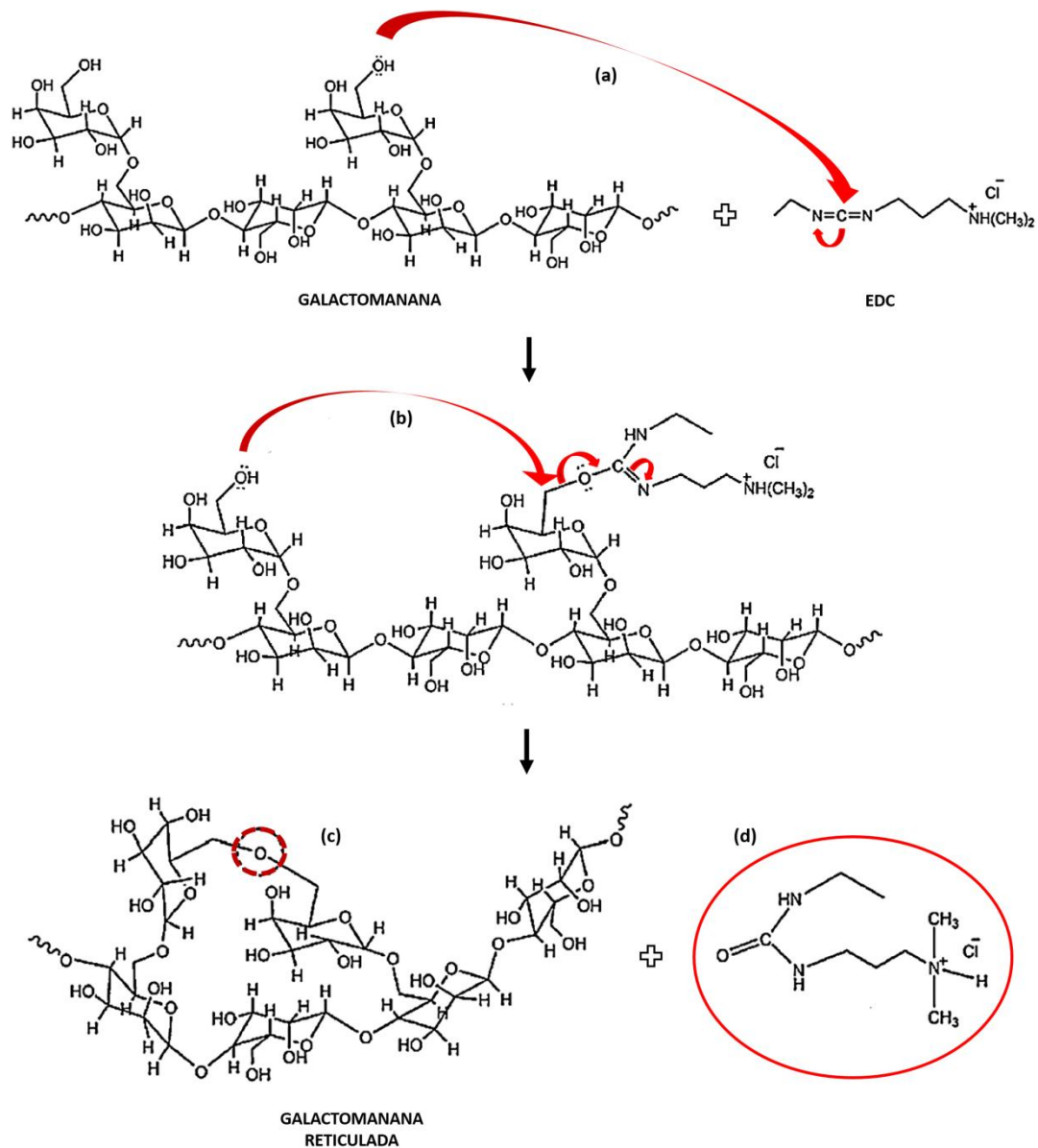


Figura 8- Mecanismo de reação da reticulação da galactomanana com EDC.

Fonte: Adaptado de Banegas et al. (2013).

Dessa forma o EDC não fica presente na estrutura do polissacarídeo, e a confirmação da formação do subproduto da ureia pode ser verificada a partir leitura da água de lavagem da reticulação da biomembrana, por meio da espectroscopia de UV-vis no comprimento de onda 263 nm (BANEGAS et al., 2013).

No processo de desenvolvimento de biomembranas reticuladas pela Rota 1 o biomaterial obtido apresenta insolubilidade por até 24 horas quando imersa em água, aparência pouco transparente, esbranquiçada, textura rugosa, fina e flexível (Figura 9B). Pela Rota 2, a

biomembrana confeccionada mantém sua integridade quando imersa em água por até 24h, apresentando-se incolor, transparente, superfície irregular, fina e flexível (Figura 9C). Nesses processos de confecção de biomembranas incorporadas com clorexidina sugere-se que o fármaco fique preso entre a malha da estrutura polissacarídica reticulada. Assim também propunha Ambrogi et al. (2016) para filmes de quitosana adsorvidas de clorexidina.

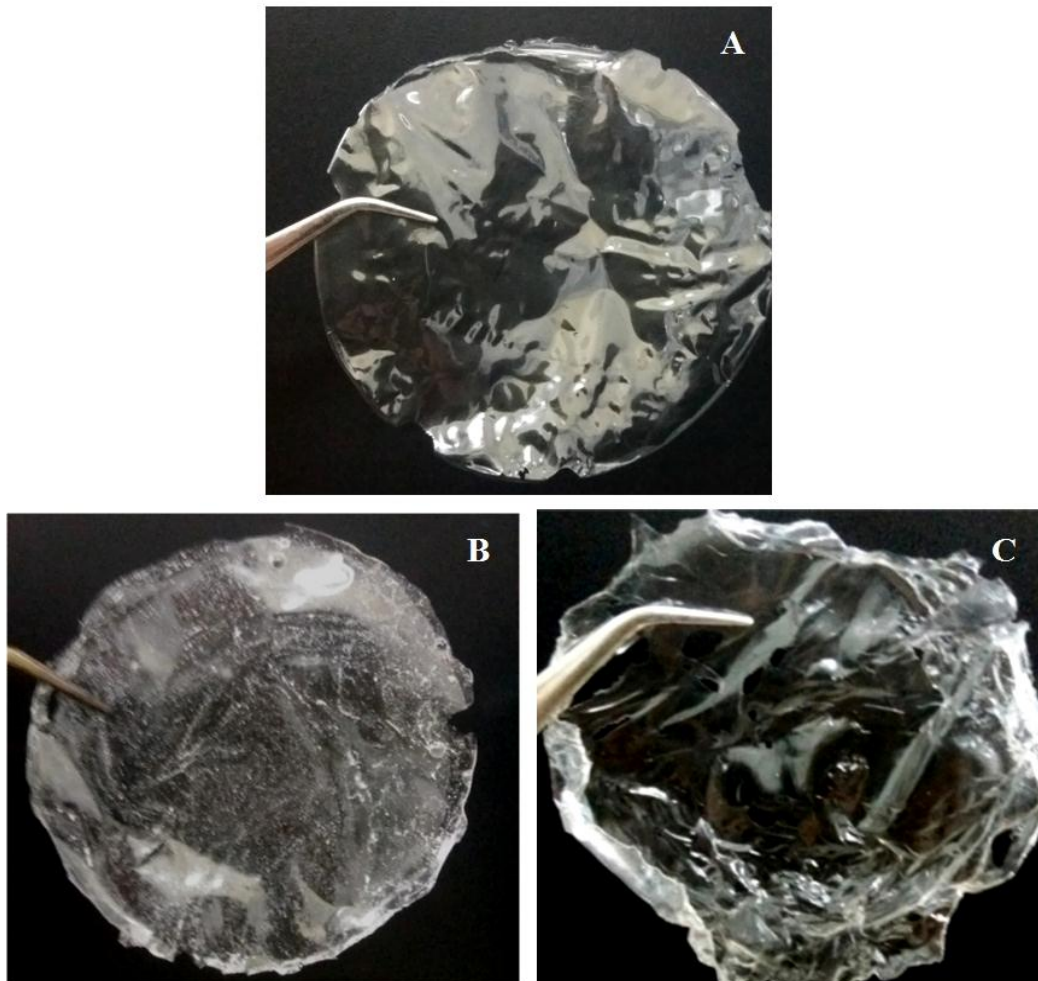


Figura 9– Aspecto físico das biomembranas BR (A), R1 (B) e R2 (C).

5.2 Caracterização das Biomembranas de Galactomanana

5.2.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização por FTIR (Figura 10) revela a presença de bandas características de grupos funcionais da galactomanana e da clorexidina nas biomembranas R1 e R2. Os comprimentos de onda e os grupos característicos de cada um são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Comprimentos de onda e grupos químicos presentes nas biomembranas por FTIR.

BANDAS (cm ⁻¹)	GRUPOS QUÍMICOS ASSOCIADOS
3500-3100	O-H
2921	C-H
1647	O-H
1640	C=N
1637	C=N
1560-1490	N-H/ C=C de aromáticos
1419	C-H
1150, 1080 e 1020	C-O-C/ O-H
871	β-Manopiranoses
812	α-Galactopiranoses

No espectro correspondente à estrutura da biomembrana polissacarídica não reticulada (BC) e reticulada (BR) observam-se bandas características de estiramento O-H (3500-3100 cm⁻¹) (QI et al., 2016) e C-H (2921 cm⁻¹) (KAITH; SHARMA; KALIA, 2015). Vibrações de flexão de O-H (1647 cm⁻¹) e de C-H (1419 cm⁻¹) (BANEGAS et al., 2013) e bandas indicando a presença de unidades de ligação alfa D-galactopiranoses (812 cm⁻¹) e unidades de ligação beta D-manopiranoses (871 cm⁻¹) também são observadas (FIGUEIRO, 2004). Ainda verificam-se vibrações de estiramento de um grupo de bandas em 1150, 1080 e 1020 cm⁻¹, correspondentes a ligações glicosídicas C-O-C e dobramentos de O-H de álcoois (PITOMBEIRA et al., 2015).

A diferença que demonstra a incorporação da clorexidina à estrutura das biomembranas polissacarídicas reticuladas em R1 e R2 pode ser confirmada pela presença de bandas entre 1560 a 1490 cm⁻¹, bem destacadas (em vermelho) em 1560 cm⁻¹ (R1) e 1533 cm⁻¹ (R2), atribuídas a vibrações de deformação de N-H e vibrações de estiramento de C=C de aromáticos. Além disso, verificam-se bandas em 1637 cm⁻¹ (R1) e 1640 cm⁻¹ (R2) referentes a vibrações de estiramento C=N (SAMLÍKOVÁ et al., 2017).

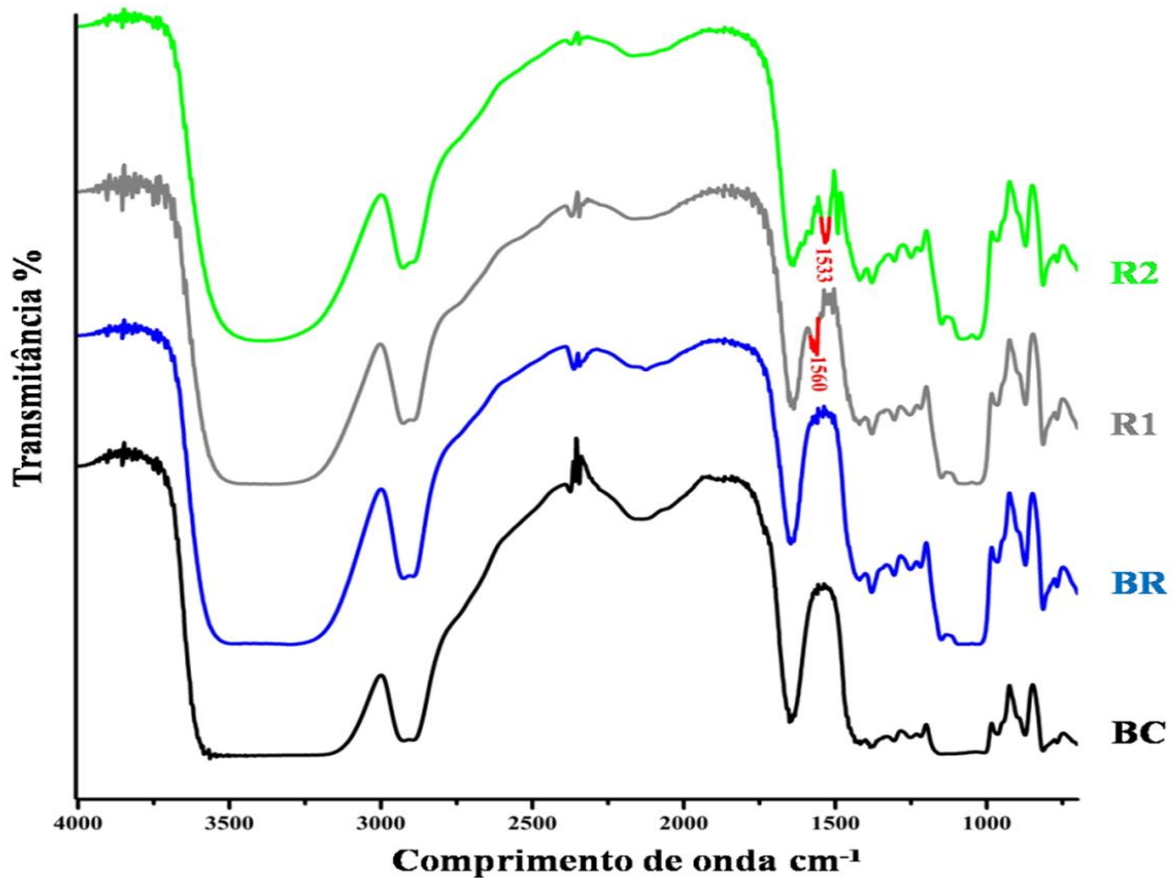


Figura 10 - Espectros de FTIR das biomembranas BC, BR, R1 e R2, realizados em modo de transmissão com faixa de leitura espectral de 4000 a 700 cm^{-1} .

5.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria Derivada (DTG)

A TGA permitiu analisar a estabilidade térmica das biomembranas desenvolvidas, verificando o perfil de degradação térmica da BC, o efeito do processo de reticulação na degradação térmica da BR, e o efeito da reticulação e incorporação de clorexidina no perfil termogravimétrico em R1 e R2. A DTG possibilita determinar com exatidão os picos de temperatura máxima de perda de massa em cada evento das curvas termogravimétricas.

As curvas de TGA (curva verde) e DTG (curva azul) das biomembranas BC, BR, R1 e R2 são demonstradas na Figura 11, todas apresentando três eventos de perda de massa com comportamentos semelhantes.

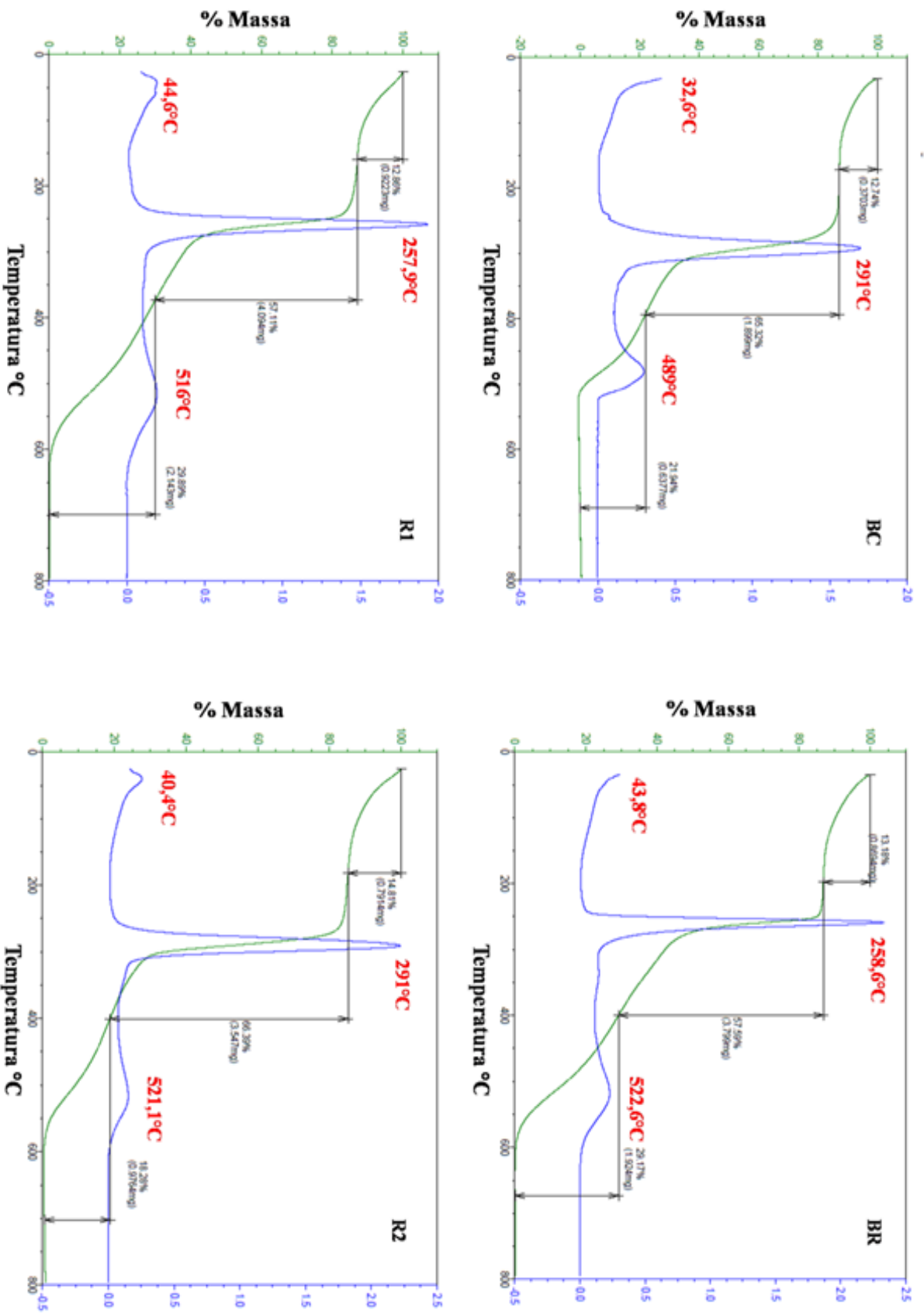


Figura II - Termogramas da análise termogravimétrica (TGA) (em verde), e da sua derivada (DTG) (em azul), das biomembranas BC, BR, R1 e R2 sob taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de ar sintético com fluxo de 60 mL/min e varredura no intervalo de temperatura entre 25 e 800°C

Os parâmetros termogravimétricos: Temperatura inicial de decomposição (T_i) e Temperatura máxima de decomposição (T_{max}) e percentual de resíduo podem ser verificadas na tabela 2.

Tabela 2- Parâmetros de estabilidade térmica das biomembranas BC, BR, R1 e R2.

Amostras	T_i (°C)	T_{max} nos eventos (°C)			Resíduo em 800°C (%)
		I	II	III	
BC	167,6	32,6	291	489	0
BR	201,3	43,8	258,6	522,6	0,06
R1	161	44,62	257,9	516	0,14
R2	188,6	40,43	291	521,1	0,52

O primeiro evento de degradação térmica (I) em todas as biomembranas confeccionadas é atribuído à evaporação de produtos de baixa massa molar, correspondente à evaporação de água adsorvida nas amostras (BONA, 2007; LIYANAGE et al., 2015). Esta etapa teve início antes de 35°C para todas as biomembranas desenvolvidas e a degradação de massa está próxima de 14%. Comportamento semelhante foi observado nos estudos de Monteiro et al. (2009) de goma de galactomana de *D. gardneriana* não reticulados e reticulados com glutaraldeído.

O segundo evento de degradação térmica (II) ocorre no intervalo de 167,3-389,1°C para BC, 201-397,6°C para BR, 161-372,9°C em R1 e 188,6-400,1°C em R2. Este fato indica aumento de estabilidade térmica de BR se comparado a BC. A mesma característica também foi observada em R2, onde o efeito da reticulação e incorporação da clorexidina melhorou sua estabilidade térmica. Já em R1 este acontecimento não se pronunciou de maneira significativa, pois as temperaturas de início-término da segunda fase foram próximas da Biomembrana Controle (BC). Nesse evento também ocorre a perda máxima de massa das biomembranas, observando-se menor porcentagem de perda em BR (57,59%) e R1 (57,11%) em relação à BC (65,32%) e R2 (66,39%). As Temperaturas máximas de decomposição (T_{max}) obtidas pela DTG nesse evento ocorrem em 291°C (BC), 258,6°C (BR), 257,9°C (R1) e 291,8°C (R2). Essa etapa é atribuída à degradação da cadeia polimérica de galactomanana que constitui as biomembranas (CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2007; KAITH; SHARMA; KALIA, 2015). Banegas et al. (2013) obteve resultados similares utilizando filmes de galactomanana de goma guar não reticulados e reticulados com EDC.

Geralmente os biomateriais reticulados apresentam temperaturas máximas de decomposição menores que o polissacarídeo não modificado (MONTEIRO, 2009), o que pode ser confirmado nas biomembranas deste estudo com exceção da R2 que praticamente não possui diferença de T_{max} comparada à BC. Esse acontecimento pode ser explicado pelo fato que ocorre uma catálise ácida, reduzindo o grau de polimerização e a quebra de ligações de hidrogênio previamente existentes nos locais onde a reticulação ocorreu. Além disso, a pirólise de polímeros causada por cisões aleatórias das ligações glicosídicas, como ocorre neste caso, é seguida por um novo evento de decomposição de massa (GLIKO-KABIR; PENHASI; RUBINSTEIN, 1999; MONTEIRO, 2009), que caracteriza o terceiro evento.

O terceiro evento (III) apresenta T_{max} variando de 489 a 522,6°C para todas as biomembranas confeccionadas, demonstrando perda progressiva de massa atribuída à quebra adicional dos constituintes das biomembranas (MARTINS et al., 2012). Os resíduos das amostras ao final de 800°C são próximos de zero, haja vista que não há presença de metais nas biomembranas.

5.2.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A Microscopia de Força Atômica (AFM) é uma ferramenta útil para investigar a superfície e estrutura de materiais poliméricos, principalmente para fornecer informações qualitativas e quantitativas em nanoescala (YANG et al., 2007).

Na caracterização por AFM foram explorados os parâmetros de rugosidade e topografia. Os diferentes aspectos morfológicos das biomembranas são apresentados na Figura 12. As biomembranas apresentam topografia irregular com picos de altura variando entre 25 e 34 nm.

À primeira vista, a superfície da BC apresenta superfície mais homogênea em relação às demais reticuladas (BR, R1 e R2). A incorporação da CHX, bem como a rota de incorporação (R1 ou R2) também modifica a superfície das membranas, onde a rugosidade média (nm) obtida foi de 1,83±0,18 nm (**BC**), 1,99±0,3 nm (**BR**), 2,38±0,17 nm (**R1**) e 2,25±0,23 nm (**R2**) (Tabela 3). Apesar de apresentarem valores de rugosidade diferentes, não houve diferença significativa entre as médias (Figura 13).

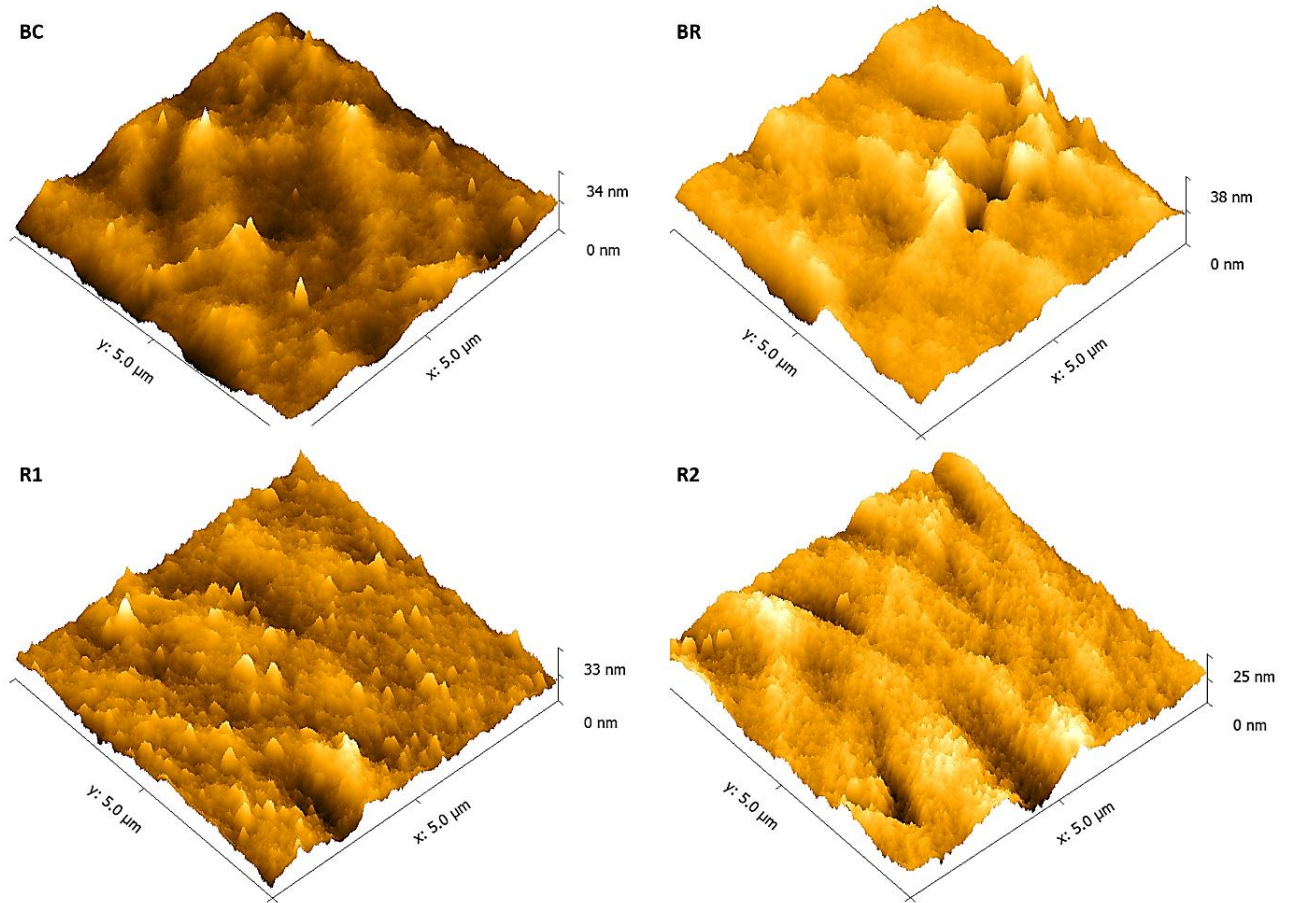


Figura 12 - Imagens em 3D (5 μm x 5 μm) de AFM da BC, BR, R1 e R2.

Tabela 3- Rugosidade média (nm) das biomembranas.

Biomembrana	Rugosidade (nm)
BC	1,83 \pm 0,18
BR	1,99 \pm 0,3
R1	2,38 \pm 0,17
R2	2,25 \pm 0,23

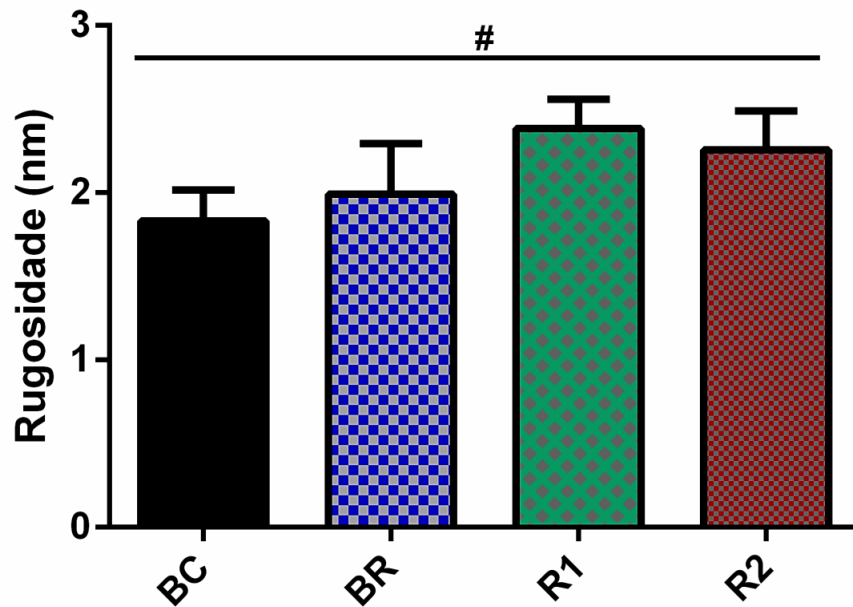


Figura 13 - Rugosidade média (nm) das biomembranas BC, BR, R1 e R2. # sem significância estatística, $p > 0,05$.

A rugosidade em nano ou microescala é importante, pois podem desempenhar papel crucial no processo de cicatrização auxiliando na diferenciação e regeneração tecidual em feridas (PRAMANIK et al., 2015) e também podendo influenciar na interação da superfície de biomembranas com as bactérias e consequentemente na atividade antibacteriana (LUO et al., 2017).

Filmes confeccionados à base de galactomanana de goma guar com polihidroxialcanoatos (plastificante) e curcumina incorporada demonstraram que: filmes de galactomanana pura apresentaram rugosidades em sua estrutura, onde cristas e depressões uniformes podiam ser observadas e que houve aumento consecutivo da rugosidade com o aumento do plastificante nos filmes confeccionados (PRAMANIK et al., 2015).

A investigação da morfologia de filmes de quitosana puro e quitosana/goma guar/vanilina constatou que a topografia do filme de quitosana puro apresentava-se lisa, já na mistura possuía superfície irregular bulbosa, havendo ligeiro aumento das rugosidades quando o conteúdo de goma guar/vanilina também aumentava (CHOUGALE; KASAI; MASTI, 2016).

Analisando a morfologia de membranas de amido puro esta demonstra-se lisa, e quando são formadas pela mistura com nanocelulose apresentam rugosidades associadas aos prolongamentos desta (VIGNESHWARAN; AMMAYAPPAN; HUANG, 2011).

Dessa forma, verifica-se que a adição de outros constituintes, sejam eles outros polímeros ou plastificantes, na composição de filmes ou membranas, podem proporcionar alterações na rugosidade superficial, apresentando aspectos topográficos distintos.

5.3 Teste antibacteriano

A atividade antibacteriana das biomembranas foi verificada pela presença ou ausência de zona de inibição de crescimento bacteriano sob as biomembranas testadas e/ou ao redor delas, onde o resultado do teste pode ser visualizado na Figura 14.

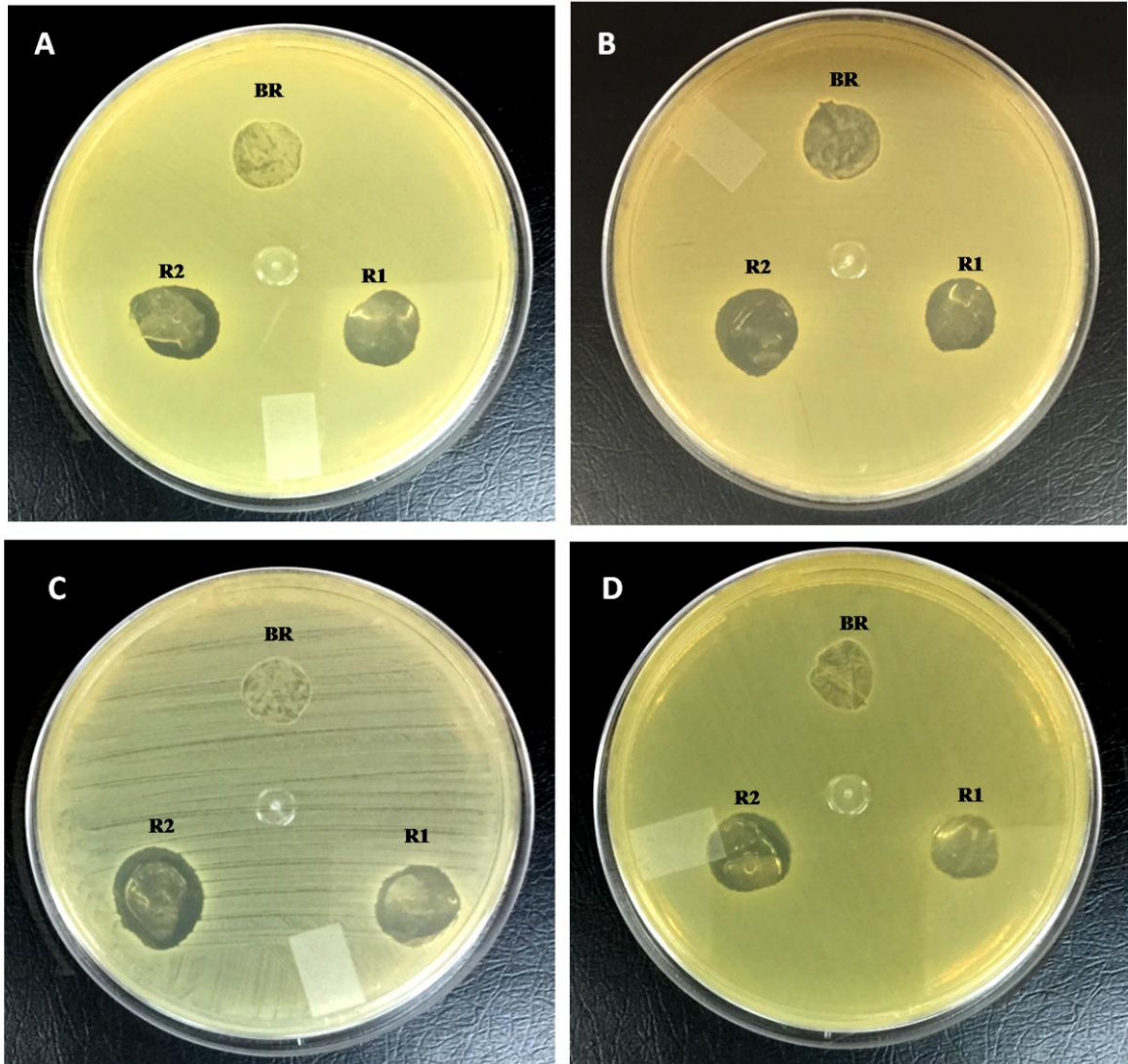


Figura 14- Teste antibacteriano das biomembranas BR, R1 e R2 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (A), *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA- “Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*”) (B), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (C) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (D) após 24h de incubação.

Ao analisar as placas do teste após as 24 horas de incubação verifica-se que a biomembrana reticulada (BR) que não continha o fármaco não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano das estirpes Gram positivas: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA- “Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*”) e Gram-negativa: *Escherichia coli* ATCC

25922. Enquanto as biomembranas R1 e R2 apresentaram zona de inibição do crescimento bacteriano contra linhagens supracitadas.

Foram utilizadas bactérias Gram-positivas e uma estirpe Gram-negativa para verificar a ação da clorexidina incorporada nas biomembranas, tendo em vista a diferença de estrutura entre elas. Além disso, também se deve levar em consideração a diferença no perfil de susceptibilidade das bactérias, pois pode existir presença de fatores de virulência ou o desenvolvimento.

A biomembrana controle também foi testada e não apresentou atividade antibacteriana. Este resultado corrobora os testes antibacterianos utilizando revestimentos de frutas confeccionados a partir de galactomanana de *Adenantha pavonina*, onde foi constatado que não são detentores de atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, contudo quando a galactomanana foi associada à quitosana apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SOARES, 2009).

O resultado do teste antibacteriano também confirma a incorporação do fármaco nas biomembranas R1 e R2. Tendo em vista que a membrana reticulada não possui atividade antibacteriana, conclui-se que o efeito das biomembranas incorporadas com clorexidina deste estudo seja do próprio fármaco.

Desta maneira a clorexidina tem a capacidade de se ligar tanto aos lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativas, quanto aos ácidos lipoproteicos presentes nas bactérias Gram-positivas (HAGI et al., 2015).

As médias das áreas de inibição do crescimento bacteriano variaram de 117,05 mm² a 244 mm², conforme podem ser observadas na Tabela 4. Comparações entre as médias foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA) e constatou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre as áreas de inibição do crescimento de R1 e R2 em relação à BR para todas as bactérias testadas.

Tabela 4- Área média de inibição dos halos (mm²) e Erro Padrão da Média (EPM) no teste antibacteriano.

Bactérias	R1	EPM	R2	EPM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	127,96	14,92	170,64	17,73
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	117,05	4,30	156,1	4,31
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	159,2	8,50	244	34,19
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	135,44	39,42	148,94	33,31

Constatou-se também que R2 apresentou maior halo de inibição comparado a R1 para bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, MRSA e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228) e que apenas para *E. coli* não houve diferença estatisticamente significativa do tamanho da área do halo inibitório (Figura 15).

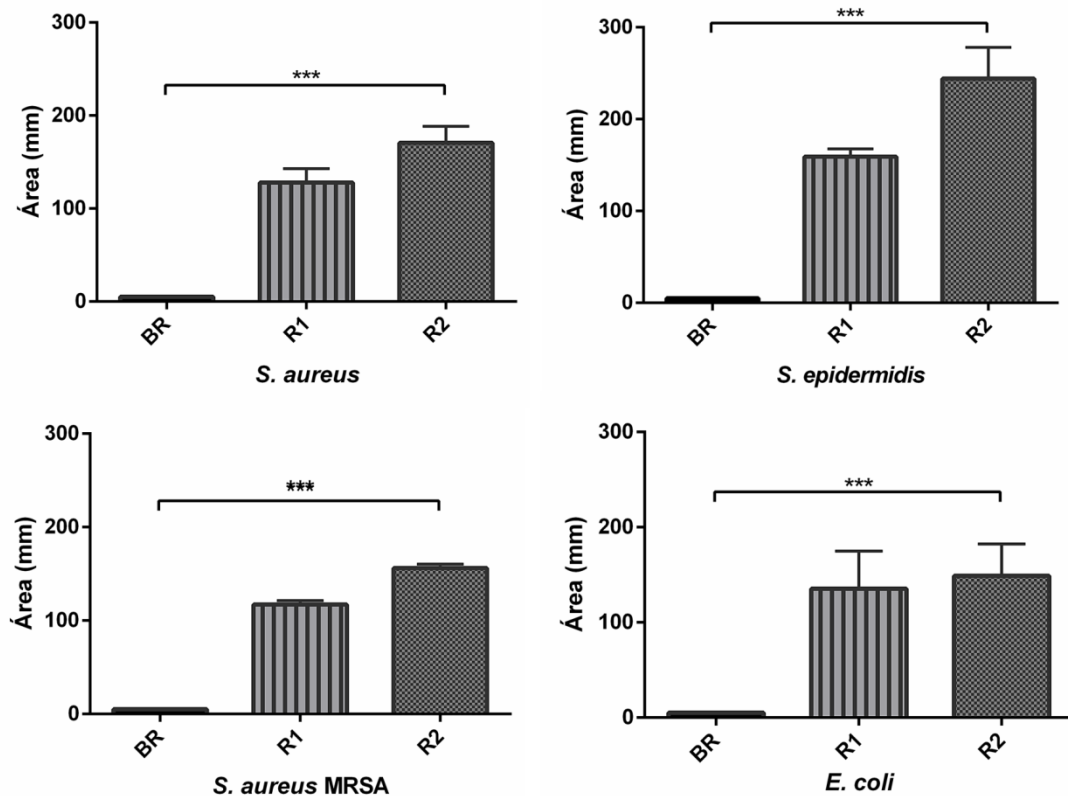


Figura 15 - Área dos halos inibitórios das biomembranas BR, R1 e R2 em cada bactéria testada.

***diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A clorexidina pode ser bactericida ou bacteriostática dependendo da concentração empregada (CUOZZO, 2013); além disso, dados encontrados na literatura apontam que microorganismos Gram-positivos são susceptíveis à clorexidina livre à partir de 0,12% (OLIVEIRA, 2004). Estudos realizados em plataformas a base de celulose com clorexidina a 3% (CAVALLARI et al., 2015) e plataformas de vermiculite com CHX a 1,3% demonstraram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e negativas (SAMLÍKOVÁ et al., 2017).

As bactérias utilizadas nesse estudo fazem parte da microbiota da pele; portanto, podem contaminar o tecido lesionado e infeccionar feridas, dificultando o processo de cicatrização tecidual e cura da lesão (DRYDEN, 2009). Tendo em vista a atividade antibacteriana das biomembranas, sugere-se uma potencial aplicação delas como curativos antimicrobianos biodegradáveis que podem proteger contra contaminantes externos e microorganismos residentes capazes de debelar uma infecção.

6 CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado pode-se concluir que a incorporação de clorexidina por meio das duas rotas de confecção das biomembranas pode ser confirmada por caracterização de FTIR.

As biomembranas apresentam características físicas diferentes, verificando a efetividade de sua reticulação, haja vista que adquiriram insolubilidade em meio aquoso por 24 horas quando comparada à biomembrana de galactomanana não reticulada.

Através da TGA e DTG pode-se constatar melhoria da estabilidade térmica de BR e R2 em relação à BC.

Através análise da Microscopia de Força Atômica observou-se que as superfícies das biomembranas são irregulares, porém não havendo diferença estatisticamente significativa entre as suas rugosidades.

As biomembranas R1 e R2 apresentaram atividade antibacteriana, fato que também confirma a incorporação do fármaco na estrutura polissacarídica, demonstrando o potencial das biomembranas desenvolvidas para uma possível aplicação como curativo antibacteriano.

A biomembrana reticulada (BR) pode ser utilizada como plataforma para carregamento de outros fármacos ou moléculas bioativas com propriedades diversas.

7 PERSPECTIVAS

Para complementar as caracterizações deste estudo pretende-se realizar caracterizações da BC, BR, R1 e R2 por meio de testes mecânicos e grau de intumescimento. Além disso, serão verificadas a presença de citotoxicidade destas biomembranas, o total de clorexidina real incorporada em R1 e R2 e o seu perfil de liberação em R1 e R2.

Testes *in vivo* também devem ser realizados para verificar a ação antibacteriana e cicatrizante do biomaterial desenvolvido.

Referências

- ABDULLAH, F.; GHOSH, S. K.; BASU, S.; MUKHERJEE, A. Cationic guar gum orchestrated environmental synthesis for silver nano-bio-composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 30–37, 2015.
- ABREU, A. S. et al. Antimicrobial nanostructured starch based films for packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 127–134, 2015.
- AGARWAL, A. et al. Polymeric multilayers that localize the release of chlorhexidine from biologic wound dressings. **Biomaterials**, v. 33, p. 6783–6792, 2012.
- ALBOOFETILEH, M. et al. Antimicrobial activity of alginate / clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogens. **Food control**, v. 36, p. 1–7, 2014.
- ALMEIDA, R. R. et al. Exploring the potential of *Dimorphandra gardneriana* galactomannans as drug delivery systems. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 284–289, 2015.
- ALTIOK, D.; ALTIOK, E.; TIHMINLIOGLU, F. Physical , antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, p. 2227–2236, 2010.
- AMBROGI, V. et al. Montmorillonite – chitosan – chlorhexidine composite films with antibiofilm activity and improved cytotoxicity for wound dressing. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 491, p. 265–272, 2016.
- ANJUM, S. et al. Development of novel wound care systems based on nanosilver nanohydrogels of polymethacrylic acid with Aloe vera and curcumin. **Materials Science and Engineering C**, v. 64, p. 157–166, 2016.
- BANEGAS, R. S. et al. Preparation , Characterization and Properties of Films Obtained from Cross-linked Guar Gum. **Polímeros**, v. 23, p. 182–188, 2013.
- BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 19–34, 2004.
- BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing - A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, p. 3653–3680, 2015.
- BOATENG, J. S. et al. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems : A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892–2923, 2008.
- BONA, J. C. **Preparação e caracterização de filmes biodegradáveis a partir de blendas de amido com polietileno**. 2007. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- BOWLER, P. G.; DUERDEN, B. I.; ARMSTRONG, D. G. Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 244–269, 2001.
- CAVALLARI, C. et al. Ex-vivo and in-vitro assessment of mucoadhesive patches containing the gel-forming polysaccharide psyllium for buccal delivery of chlorhexidine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, p. 593–600, 2015.
- CERQUEIRA, M. A. et al. Extraction , purification and characterization of galactomannans

- from non-traditional sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 408–414, 2009.
- CERQUEIRA, M. A. et al. Galactomannans use in the development of edible films / coatings for food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 662–671, 2011.
- CHOI, D. et al. Nano-film coatings onto collagen hydrogels with desired drug release. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 36, p. 326–333, 2016.
- CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M02–A10. Wayne, Pa, 2012.
- CHOUGALE, R.; KASAI, D.; MASTI, S. Preparation and Evaluation of Surface Morphology and Swelling Behavior of Ternary Blend Films. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 7, p. 241–248, 2016.
- COSTALONGA, B. L. P. et al. Interaction of chlorhexidine with biomembrane models on glass ionomer by using the Langmuir – Blodgett technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 97, p. 57–61, 2012.
- CUNHA, P. L. R. et al. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra Gardneriana* Tul . seeds as a potential guar gum substitute. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 880–885, 2009.
- CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M. DE; FEITOSA, J. P. A. Purification of guar gum for biological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 324–331, 2007.
- CUOZZO, R. C. **Produção e Caracterização de Microesferas Biocerâmicas Adsorvidas de Clorexidina para Aplicação como Enxertos Ósseos**. 2013. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro.
- DAS, D. et al. New water resistant biomaterial biocide film based on guar gum. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5878–5883, 2011.
- DAUD, N. M. et al. Immobilization of antibacterial chlorhexidine on stainless steel using crosslinking polydopamine film : Towards infection resistant medical devices. **Colloids and Surfaces B : Biointerfaces**, v. 145, p. 130–139, 2016.
- DHANAPAL, A. et al. Edible films from Polysaccharides. **Food Science and Quality Management**, v. 3, n. 1, p. 9–18, 2012.
- DRYDEN, M. S. Skin and soft tissue infection : microbiology and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 1, p. 2–7, 2009.
- EATON, P; WEST, P. **Atomic Force Microscopy**. Oxford University Press Inc., New York, 2010.
- ECHAGUE, C. G.; HAIR, P. S.; CUNNION, K. M. A Comparison of Antibacterial Activity against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Gram-negative Organisms for Antimicrobial Compounds in a Unique Composite Wound Dressing. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 23, n. 9, p. 406–413, 2010.
- EGOZI, D. et al. Biodegradable soy wound dressings with controlled release of antibiotics : Results from a guinea pig burn model. **Burns**, v. 41, n. 7, p. 1459–1467, 2015.
- ELSNER, J. J.; SHEFY-PELEG, A.; ZILBERMAN, M. Novel Biodegradable Composite Wound Dressings With Controlled Release of Antibiotics : Microstructure , Mechanical and Physical Properties. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied**

Biomaterials, v. 93, p. 425–435, 2010.

FIGUEIRO, S. D. On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan – collagen films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 313–320, 2004.

FILIZOLA, B. C. **Bos Práticas de manejo para o extrativismo Sustentável da Fava d’Anta**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2013.

GEMIN, E. **Determinação da Atividade Antiviral de Galactomananas Sulfatadas contra o Vírus Herpes Simplex Tipo 1 (HSV-1)**. 2008. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade federal do Paraná, Curitiba.

GLIKO-KABIR, I.; PENHASI, A.; RUBINSTEIN, A. Characterization of crosslinked guar by thermal analysis. **Carbohydrate Research**, v. 316, p. 6–13, 1999.

GOUVÊA, D. M.; MENDONÇA, R. C. S.; SOTO, M. L. Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, 2015.

HAGI, A.; IWATA, K.; NII, T.; NAKATA, H.; TSUBOTANI, Y.; INOUE, Y. Bactericidal Effects and Mechanism of Action of Olanexidine Gluconate, a New Antiseptic. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4551–4559, 2015.

HIDALGO, E.; DOMINGUEZ, C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p. 271–276, 2001.

HUGO, W. E.; LONGWORTH, A. R. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 16, p. 655–662, 1964.

JANA, P. et al. Preparation of guar gum scaffold film grafted with ethylenediamine and fish scale collagen, cross-linked with ceftazidime for wound healing application. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 573–581, 2016.

JIAN, H.; ZHUA, L.; ZHANG, W.; SUN, D.; JIANG, J. Galactomannan (from *Gleditsia sinensis* Lam.) and xanthan gum matrix tablets for controlled delivery of theophylline: In vitro drug release and swelling behavior. **Carbohydrates polymers**, v. 87, p. 2176–2182, 2012.

KAITH, B. S.; SHARMA, R.; KALIA, S. Guar gum based biodegradable, antibacterial and electrically conductive hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 266–275, 2015.

KIM, J. et al. Chlorhexidine-loaded xanthan gum-based biopolymers for targeted, sustained release of antiseptic agent. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 32, p. 44–48, 2015.

KOK, M. S.; HILL, S. E.; MITCHELL, J. R. A comparison of the rheological behaviour of crude and refined locust bean gum preparations during thermal processing. **Carbohydrates Polymers**, v. 38, p. 261–265, 1999.

LANDIM, L. P.; COSTA, J. G. M. DA. *Dimorphandra gardneriana* Tulasne (Fava d’anta) - Uma abordagem etnobotânica e riscos de extinção. **Revista da Biologia**, v. 9, p. 6–11, 2012.

LEE, M.; CHEN, H.; TSAO, S. Preparation, characterization and biological properties of Gellan gum films with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 920–926, 2010.

LUO, C. et al. Antibacterial activity and cytocompatibility of chitoooligosaccharide-modified polyurethane membrane via polydopamine adhesive layer. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 235–243, 2017.

- LIYANAGE, S. et al. Chemical and physical characterization of galactomannan extracted from guar cultivars (*Cyamopsis tetragonolobus* L.). **Industrial Crops & Products**, v. 74, p. 388–396, 2015.
- MARTINS, J. T. et al. Synergistic effects between k -carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 280–289, 2012.
- MONTEIRO, A. A. S. **Síntese e Caracterização de Géis de Galactomanana de Fava Danta (*Dimorphandra gardneriana*) para Aplicação Biológica**. 2009. 86f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- MOURA NETO, E. et al. Chemically sulfated galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* seed : Characterization and toxicity evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. September 2006, p. 1013–1017, 2014.
- MUSCHER, D. M. et al. The Current Spectrum of Staphylococcus aureus Infection in a Tertiary Care Hospital. **Medicine**, v. 73, p. 186–208, 1994.
- NAM, K. et al. Acta Biomaterialia Preparation of a collagen / polymer hybrid gel designed for tissue membranes. Part I : Controlling the polymer – collagen cross-linking process using an ethanol / water. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 403–408, 2010.
- OLIVEIRA, R. A. **Avaliação do efeito antimicrobiano in vitro de quitosana e da associação quitosana/clorexidina sobre saliva e *Streptococcus mutans***. 2004. 96f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). Universidade de São Paulo, São Carlos.
- PANEGASSI, V. R.; SERRA, G. E.; BUCKERIDGE, M. S.. Potencial tecnológico do galactomanano de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis*) para uso na indústria de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.3, p.406-415, 2000.
- PITOMBEIRA, N. A. O. et al. Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum : Characterization and evaluation as potential drug carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 610–615, 2015.
- PRAJAPATI, V. D. et al. International Journal of Biological Macromolecules Galactomannan : A versatile biodegradable seed polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 83–92, 2013.
- PRAMANIK, N. et al. Characterization and evaluation of curcumin loaded guar gum / polyhydroxyalkanoates blend films for wound healing applications. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 5, p. 63489–63501, 2015.
- PUCHER, J. J.; DANIEL, J. C. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. **Journal of Periodontology**, v. 63, n. 6, p. 526-532, 1992
- QI, G. et al. Effects of glycerol and nanoclay on physiochemical properties of camelina gum-based films. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 747–754, 2016.
- RAO, M. S. et al. Chitosan and guar gum composite films : Preparation , physical , mechanical and antimicrobial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1243–1247, 2010.
- RIBEIRO-SILVA, S.; SCARIOT, A.; MEDEIROS, M. B. DE. Uso e Práticas de Manejo de Faveira (*Dimorphandra gardneriana* Tul.) na Região da Chapada do Araripe, Ceará : Implicações Ecológicas e Sócio-Econômicas. **Biodiversidade Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 65–73, 2012.
- SADER, H. S.; FLAMM, R. K.; JONES, R. N. Antimicrobial activity of ceftaroline and

- comparator agents tested against bacterial isolates causing skin and soft tissue infections and community-acquired respiratory tract infections isolated from the Asia-Pacific region and South Africa (2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, p. 61–68, 2013.
- SALVALAGGIO, M. D. O. **Galactomananas de Sementes de Espécies Brasileiras: Otimização da Extração, Caracterização Físico-química e por Espalhamento de Luz**. 2010. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciência-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- SALVALAGGIO, M. O.; FREITAS, R. A.; FRANQUETTO, E. M.; KOOP, H. S.; SILVEIRA, J. L. M. Influence of the extraction time on macromolecular parameters of galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, v.116,p. 200–206, 2015.
- SAMLÍKOVÁ, M. et al. Preparation of antibacterial chlorhexidine/vermiculite and release study. **International Journal of Mineral Processing**, v. 159, p. 1–6, 2017.
- SANTOS, E. C. M. O. **Filmes Biodegradáveis de Galactomanana: Uso na Conservação de Frutos**. 2012. 145f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- SAVI JUNIOR, R. **Avaliação Macromolecular e Hidrodinâmica de Xantana e Galactomananas Nativas por Espalhamento de Luz**. 2014. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- SIQUEIRA, N. M. et al. Gelatin and galactomannan-based scaffolds: Characterization and potential for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 8–18, 2015.
- SOARES, C. E. A. **Caracterização estrutural e potencial da galactomanana de *Adenantha pavonina* L. como matéria-prima para produção de filmes comestíveis bioativos**. 2009. 261f. Dissertação (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- TUMMALAPALLI, M. et al. Composite Wound Dressings of Pectin and Gelatin with Aloe vera and Curcumin as Bioactive Agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 104–113, 2015.
- TWUM-DANSO, K. et al. Microbiology of postoperative wound infection : prospective study of 1770 wounds. **Journal of Hospital Infection**, v. 21, p. 29–37, 1992.
- VIGNESHWARAN, N.; AMMAYAPPAN, L.; HUANG, Q. Effect of Gum arabic on distribution behavior of nanocellulose fillers in starch film. **Applied Nanoscience**, v. 1, p. 137–142, 2011.
- VULPE, R. et al. Rheological study of in-situ crosslinkable hydrogels based on hyaluronic acid , collagen and sericin. **Materials Science and Engineering C**, v. 69, p. 388–397, 2016.
- WU, S. C. et al. Use of chlorhexidine- impregnated patch at pin site to reduce local morbidity : the ChIPPS Pilot Trial. **International Wound Journal**, v. 5, n. 3, 2008.
- YANG, H.; WANG, Y.; LAI, S.; AN, H.; LI, Y.; CHEN, F. Application of atomic force microscopy as a nanotechnology tool in food science. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 4, p. 65–75, 2007.