



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA- UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE- CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO
E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTO - PPgDITM
UFPB/UFRN/UFC/UFRPE



**COMPARAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE ORÉGANO E TOMILHO CONTRA CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* E
INCORPORAÇÃO EM MEMBRANAS DE QUITOSANA PARA O TRATAMENTO
DE LESÕES POR PRESSÃO**

SONALY DE LIMA SILVA

JOÃO PESSOA

2023

SONALY DE LIMA SILVA

**COMPARAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE ORÉGANO E TOMILHO CONTRA CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* E
INCORPORAÇÃO EM MEMBRANAS DE QUITOSANA PARA O TRATAMENTO
DE LESÕES POR PRESSÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Área de concentração: Inovação tecnológica em medicamentos

Orientador: Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho.
Coorientadora: Dra. Luana Abílio Diniz Melquiades de Medeiros.

JOÃO PESSOA

2023

**Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

S586c Silva, Sonaly de Lima.

Comparação do potencial antibacteriano dos óleos essenciais de orégano e tomilho contra cepas de *Klebsiella Pneumoniae* e incorporação em membranas de quitosana para o tratamento de lesões por pressão / Sonaly de Lima Silva. - João Pessoa, 2023.
115 f. : il.

Orientação: Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Coorientação: Luana Abílio Diniz Melquiades de Medeiros.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Farmacologia. 2. Fitoterapia. 3. Microbiologia.
4. Produtos naturais - Biomaterial. I. Oliveira Filho, Abrahão Alves de. II. Medeiros, Luana Abílio Diniz Melquiades de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615(043)

SONALY DE LIMA SILVA

**COMPARAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE ORÉGANO E TOMILHO CONTRA CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* E
INCORPORAÇÃO EM MEMBRANAS DE QUITOSANA PARA O TRATAMENTO
DE LESÕES POR PRESSÃO**

PARECER DA BANCA DE EXAMINADORA DE DEFESA DA TESE:

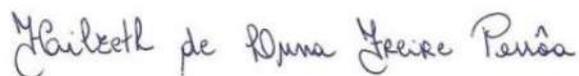
Aprovada em: 10/02/2023



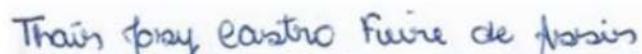
Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho
Universidade Federal da Paraíba
Orientador



Profª. Drª. Luana Abílio Diniz Melquiades de Medeiros
Universidade Federal de Campina Grande
Coorientadora



Profª. Drª. Hilzeth de Luna Freire Pessoa
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora interna à Instituição



Profª. Drª. Thais Josy Castro Freire de Assis
Universidade Federal da Paraíba

Examinadora interna à Instituição

Raline Mendonça dos Anjos.

**Prof. Dr.^a. Raline Mendonça dos Anjos
Universidade Federal de Campina Grande
Examinadora externa à Instituição**

Wladymyr Jefferson B. de Sousa

**Prof. Dr. Wladymyr Jefferson Bacalhau de Sousa
Universidade Federal de Campina Grande
Examinador externo à Instituição**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelos dons a mim reservados, por estar comigo todos os dias de minha vida, pela força, renovação da minha fé, e pela perseverança o que me possibilitou realizar o sonho de concluir o doutorado.

Aos meus pais, que me apoiaram em cada passo desta pós-graduação. São meus grandes exemplos de determinação e coragem.

A toda minha família e amigos que compreenderam e apoiaram minhas ausências em prol do presente trabalho.

Aos meus orientadores, Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho e Dra. Luana Abílio Diniz Melquiades de Medeiros pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela confiança em mim depositada, contribuindo para meu crescimento e conhecimento profissional. Levarei o sim de vocês por toda minha vida.

Ao Dr. Wladymyr Jéfferson Bacalhau Sousa, pelo tempo disponibilizado, pela confiança, amizade e contribuição neste trabalho, sempre me apontando o caminho e mostrando que sou capaz.

Aos membros da Liga Acadêmica de Fitoterapia, Bioquímica e Microbiologia (LAFBIM), em especial a Alice e Milena pela disponibilidade e pela partilha de conhecimentos.

À equipe do CERTBIO, em especial a Thiago Caju pela ajuda compartilhada a cada momento.

Aos meus amigos e colegas do doutorado que dividiram comigo os desafios e as conquistas ao longo da caminhada.

Aos professores do DITM, pelos ensinamentos prestados durante essa caminhada, em especial aos coordenadores do DITM-UFPB.

Aos professores Dr^a. Hilzeth de Luna Freire Pessoa, Dr^a. Raline Mendonça dos Anjos, Dr^a. Thais Josy Castro Freire de Assis e Dr. Wladymyr Jéfferson Bacalhau Sousa, membros da Banca Examinadora, por terem atendido ao convite para desempenhar este papel, dispondo de seu tempo e conhecimento para analisar e contribuir com este trabalho.

Aos funcionários do DITM, especialmente à Adriana, pela disponibilidade e gentileza em todas as horas.

E por fim, a fundação CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos a minha eterna gratidão, tenho certeza que Deus foi generoso comigo ao colocar cada um de vocês nesta caminhada.

RESUMO

As bactérias podem ser a causa inicial de determinadas patologias como também um agente secundário responsável pelo desenvolvimento de complicações à exemplo as infecções das lesões por pressão. E o uso exacerbado de antimicrobianos para o tratamento dessas lesões pode contribuir para a seleção de novas cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos tradicionais. Dessa forma, foi comparado o potencial antibacteriano do óleo essencial de orégano (OEO) com o do óleo essencial de tomilho (OET) sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae*, além de incorporá-los em membranas de quitosana do tipo scaffolds, para o tratamento de lesões por pressão. Para tal, foi determinada a composição química dos óleos essenciais (OEs), por meio da Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), bem como a Concentração Inibitória Mínima (CIM), a Concentração Bactericida Mínima (CBM) por micro diluição em caldo Mueller Hinton, e a Concentração Mínima de Aderência (CIMA), com o uso de tubos de ensaio. Já, voltando-se para o uso combinado dos OEs com antimicrobianos, foi desenvolvido o estudo de associação, pelo método de disco de infusão. Por fim e posteriormente a realização da análise isolada e comparativa dos óleos, foram desenvolvidas membranas de quitosana, do tipo scaffolds, incorporadas com esses OEs. Seguidamente a confecção das membranas, realizou-se a análise quanto a estrutura química, física e biológica, mediante a Microscopia ótica (MO), a Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), a Termogravimetria (TGA), ao Grau de Intumescimento (GI), a biodegradação enzimática e a atividade antimicrobiana. Dessa maneira, obteve-se como compostos majoritários dos OES - o carvacrol, o para cimeno e o timol. Para o OEO foi verificada uma CIM50 de 128µg/mL e CBM entre 512 µg/mL - 256 µg/m. Enquanto para o OET, foi observada uma CIM50 de 256µg/mL e CBM de 256 µg/mL para maioria das cepas testadas. Com relação a capacidade de inibição da formação de biofilme nem o OEO, como também o OET e nem o digluconato de clorexidina 0,12% foram capazes. Para o estudo de associação foi observado um sinergismo dos dois OEs com a ampicilina e com a gentamicina. No que se refere à caracterização das membranas, observou-se pela MO uma estrutura porosa e superfície homogênea. Já no ensaio de FTIR foi possível confirmar a incorporação dos OEs na membrana de quitosana. Os resultados de TGA indicam que não houve alteração significativa da temperatura para início das perdas de massa pelas membranas isoladas, como também, para as incorporadas com OEs. Todas as membranas apresentaram grau de intumescimento elevado. No que se refere ao ensaio de Biodegradação, observou-se que as amostras submersas em lisozima apresentaram uma maior perda de massa. E da avaliação da atividade antimicrobiana, obteve-se que as membranas puras e incorporadas apresentam capacidade de inibição do crescimento da bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Assim, conclui-se que os OEs apresentam ação antimicrobiana sobre as cepas de *Klebsiella pneumoniae* e quando incorporados em membranas de quitosana representam uma promissora modalidade terapêutica para futuro tratamento de lesões por pressão.

Palavras-chave: Biomaterial; Farmacologia; Fitoterapia; Microbiologia; Produtos naturais.

ABSTRACT

Bacteria may be the initial cause of certain pathologies as well as a secondary agent responsible for the development of complications such as pressure sore infections. And the exacerbated use of antimicrobials for the treatment of these lesions may contribute to the selection of new bacterial strains resistant to traditional antimicrobials. Thus, the antibacterial potential of oregano essential oil (OEO) was compared with that of thyme essential oil (TEO) on strains of *Klebsiella pneumoniae*, as well as their incorporation into scaffold-type chitosan membranes for the treatment of pressure ulcers. To this end, the chemical composition of the essential oils (EOs) was determined by Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (GC-MS), as well as the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) by micro dilution in Mueller Hinton broth, and the Minimum Adherence Concentration (MAC), using test tubes. Turning to the combined use of EOs with antimicrobials, the association study was developed by the infusion disc method. Finally, and after the isolated and comparative analysis of the oils, chitosan membranes were developed, scaffolds type, incorporated with these EOs. After making the membranes, the chemical, physical and biological structure was analyzed by optical microscopy (OM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), thermogravimetry (TGA), degree of swelling (DS), enzymatic biodegradation and antimicrobial activity. Thus, the majority compounds of the EOs - carvacrol, para-cymene and thymol - were obtained. For OEO, an MIC₅₀ of 128µg/mL and MBC between 512 µg/mL - 256 µg/m was verified. While for TEO, an MIC₅₀ of 256µg/mL and MBC of 256 µg/mL was observed for most of the tested strains. Regarding the ability to inhibit biofilm formation, neither the OEO, nor the TEO, nor the 0.12% chlorhexidine digluconate were able to do so. In the association study, a synergism of the two EOs was observed with ampicillin and gentamicin. Regarding the characterization of the membranes, a porous structure and homogeneous surface was observed by MO. In the FTIR test it was possible to confirm the incorporation of the EOs in the chitosan membrane. The TGA results indicate that there was no significant change in temperature for the beginning of mass loss by the isolated membranes, as well as for those incorporated with OEs. All the membranes presented a high degree of intumescence. Regarding the biodegradation test, it was observed that the samples submerged in lysozyme showed a greater loss of mass. And from the evaluation of the antimicrobial activity, it was obtained that the pure and incorporated membranes presented the capacity to inhibit the growth of *Klebsiella pneumoniae* bacteria. Thus, it is concluded that the EOs present antimicrobial action on *Klebsiella pneumoniae* strains and when incorporated into chitosan membranes they represent a promising therapeutic modality for future treatment of pressure ulcers.

Keywords: Biomaterial; Pharmacology; Phytotherapy; Microbiology; Natural Products.

INDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1. Camadas da pele	15
Figura 2. Estadiamento das LPPs	18
Figura 3. Fluxograma dos componentes da fisiopatologia das lesões por pressão	22
Figura 4. Orégano- <i>Origanum vulgare</i>	28
Figura 5. Tomilho- <i>Thymus vulgaris</i>	30
Figura 6. Fluxograma para escolha de tratamento tópico.....	35
Figura 7. Reação de desacetilação da quitina em quitosana.....	38
Figura 8. Fluxograma da confecção de membranas	49
Figura 9. Cromatograma do óleo essencial de orégano.....	55
Figura 10. Cromatograma do óleo essencial de tomilho	56
Figura 11. Aspecto macroscópico da membrana de quitosana e OEO confeccionada por evaporação de solvente.....	68
Figura 12. Membranas confeccionada por liofilização com quitosana de alto peso e médio peso com OE de orégano na concentração de 4%	69
Figura 13. Membranas de quitosana com tomilho a 3%, 4% e 5%.....	69
Figura 14. Membrana produzida por liofilização submetida a neutralização por submersão em NaOH e secagem	70
Figura 15. Membrana produzida por liofilização submetida a neutralização por meio gasoso, com hidróxido de amônio (NH_4OH).	70
Figura 16. Imagens de Microscopia Ótica de membrana de quitosana incorporada com óleo essencial de orégano a 4%	71
Figura 17. Imagens de Microscopia Ótica de membrana de quitosana incorporada com óleo essencial de tomilho 4%	72
Figura 18. Imagens de Microscopia Ótica de membrana de quitosana incorporada com óleo essencial de orégano (4%) e tomilho (4%).....	72
Figura 19. Espectro de FTIR da quitosana	74
Figura 20. Espectro de FTIR do OEO	74
Figura 21. Espectro de FTIR do OET	75
Figura 22. Espectro de FTIR da QOEO	75
Figura 23. Espectro de FTIR da QOET.....	76
Figura 24. Espectro de FTIR da QOET.....	76

Figura 25. Curva termogravimétricas de perdas da quitosana	78
Figura 26. Curva termogravimétricas de perdas do OE de orégano.....	78
Figura 27. Curva termogravimétricas de perdas do OE de tomilho.....	79
Figura 28. Curva termogravimétricas da membrana do OE de orégano a 4%.....	80
Figura 29. Curva termogravimétricas da membrana do OE de tomilho a 4%	80
Figura 30. Curva termogravimétricas da membrana com OE de orégano 4% e OE de tomilho a 4%.....	81
Figura 31. Grau de Intumescimento das membranas de quitosana e quitosana com os OEs..	83

INDICE DE ILUSTRAÇÕES

QUADROS

Quadro 1. Classificação e características dos curativos.....	32
Quadro 2. Classificação dos curativos segundo sua formulação	32
Quadro 3. Classificação dos curativos de acordo com as propriedades antimicrobianas	34

INDICE DE ILUSTRAÇÕES

TABELAS

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de orégano	54
Tabela 2. Composição química do óleo essencial de tomilho	55
Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de orégano contra diferentes cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	58
Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de tomilho contra diferentes cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	58
Tabela 5. Concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de orégano contra diferentes cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	59
Tabela 6. Concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de tomilho contra diferentes cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	60
Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima de Aderência em $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial de orégano, tomilho e do digluconato de clorexidina 0,12% contra a cepa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Kp105).....	62
Tabela 8. Estudo da associação do óleo essencial de orégano e de tomilho com antimicrobianos sintéticos.	65
Tabela 9. Perda de massa percentual das membranas de quitosana e quitosana com os OEs.	84
Tabela 10. Atividade antibacteriana das membranas de quitosana e membranas de quitosana incorporadas com óleo essencial de orégano e óleo essencial de tomilho	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AMH	Ágar Muller Hinton
AMH	Ágar Müeller Hinton
ATCC	Coleção de Microrganismos Norte Americana
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CEO	Concentração experimental obtida
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Mínima Inibitória
CIMA	Concentração Inibitória Mínima de Aderência
CT	Concentração teórica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ESBL	β -Lactamase de espectro estendido
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
IV	Infravermelho
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
Ms	Massa seca
Mf	Massa final
Mi	Massa intumescida
Mo	Massa inicial
mL	Mililitro
MO	Microscopia ótica
Q	Membranas de quitosana
QOEO	Membranas de quitosana com óleo essencial de orégano
QOET	Membranas de quitosana com óleo essencial de orégano e tomilho
QOET	Membranas de quitosana com óleo essencial de tomilho
NaOH	Hidróxido de sódio
NDM-1	Metalo- β -lactamase-1 de Nova Deli
NH₄OH	Hidróxido de amônio
Nm	Nanômetro
OEO	Óleo essencial de orégano
OEs	Óleos essenciais

OET	Óleo essencial de tomilho
ON	Óxido nítrico
OR	Orégano
OT	Tomilho
TGA	Termogravimetria
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFC/MI	Unidades formadoras de colônias por mL
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UV	Ultravioleta
μg	Micrograma
μL	Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A PELE.....	15
2.2 LESÕES POR PRESSÃO	16
2.2.1 Classificação das lesões por pressão	17
2.2.2 Fatores de risco associados a lesões por pressão	19
2.2.3 Fisiopatologia das lesões por pressão	21
2.2.4 Complicações cicatriciais e infecção das LPPS	22
2.3 <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	24
2.4 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE MEDICAMENTOS	25
2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	26
2.5.1 Óleo essencial de orégano	28
2.5.2 Óleo essencial de tomilho	30
2.6 CURATIVOS	31
2.7 BIOMATERIAIS	36
2.8 QUITOSANA.....	37
3. OBJETIVOS	43
3.1. OBJETIVO GERAL.....	43
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 ÁREA DE ESTUDO E LOCALIZAÇÃO DE TESTE EXPERIMENTAIS	44
4.2 MICRO-ORGANISMOS	44
4.3 SUBSTÂNCIAS	44
4.3.1 Meios de cultura	44
4.3.2 Substâncias testes	44
4.4 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)	44
4.5 DETERMINAÇÃO DA CIM (CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA).....	45
4.6 DETERMINAÇÃO DA CBM (CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA)	46
4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ADERÊNCIA (CIMA).....	46

4.8 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORÉGANO E TOMILHO COM ANTIBACTERIANOS	46
4.9 PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS	47
4.9.1. Preparação das membranas de quitosana sem incorporação de óleo essencial (Q)	47
4.9.2. Preparação das membranas de quitosana com incorporação de óleo essencial de orégano (QO)	48
4.9.3. Preparação das membranas de quitosana com incorporação de óleo essencial de tomilho (QT).....	48
4.9.4. Preparação das membranas de quitosana com incorporação de óleo essencial de orégano e tomilho (QOEOT)	48
4.10. PROCESSO DE NEUTRALIZAÇÃO	49
4.11. CARACTERIZAÇÕES	50
4.11.1. Microscopia Ótica (MO)	50
4.11.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	50
4.11.3. Termogravimetria (TGA)	50
4.11.4. Grau de intumescimento	51
4.11.5. Biodegradação Enzimática	51
4.11.6 Atividade antibacteriana das membranas de quitosana e membranas de quitosana incorporadas com óleo essencial de orégano e óleo essencial de tomilho	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS AVALIADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)	54
5.2 DETERMINAÇÃO DA CIM, CBM E CIMA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORÉGANO E TOMILHO CONTRA CEPAS DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	57
5.3 ASSOCIAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORÉGANO E TOMILHO COM OS ANTIMICROBIANOS FRENTE A CEPAS <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	64
5.4 PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS	67
5.5 NEUTRALIZAÇÃO	70
5.6 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS	71
5.6.1 Microscopia Ótica (MO)	71
5.6.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	73
5.6.3 Termogravimetria (TGA)	77
5.6.4 Grau de intumescimento	82
5.6.5 Biodegradação Enzimática	84

5.6.6 Atividade antibacteriana das membranas de quitosana e membranas de quitosana incorporadas com óleo essencial de orégano e óleo essencial de tomilho	85
6 CONCLUSÕES	87
7 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	89
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICE A. PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA POR EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE	109
ANEXO A. ARTIGO PUBLICADO.....	111

1 INTRODUÇÃO

As bactérias representam um dos componentes críticos do microbioma humano e desempenham papéis importantes na saúde e na doença. Elas apresentam associação e são responsáveis por diversos estados de doença, como infecções do trato urinário, doenças gastrointestinais, infecções: do trato respiratório, do sistema nervoso central, de ossos e articulações; condições de pele, cursando com quadros agudos e crônicos como, por exemplo, a formação de úlceras de pressão infecciosas relativas à cicatrização de feridas. Também, têm sido associadas ao desenvolvimento de doenças como o câncer, a endometriose, entre outras (BAKER; AL-NAKKASH.; HERBST-KRALOVETZ, 2017; HANNIGAN *et al.*, 2018; PAULA *et al.*,2020; JIANG *et al.*, 2021).

A *Klebsiella pneumoniae*, por exemplo, é uma espécie de bactéria que se apresenta como uma das principais causas de infecção no homem, com altas taxas de morbimortalidade, e apontando mecanismos de resistência, os quais sobrevivem a ação de antimicrobianos. É um bacilo gram negativo, da família enterobacteriaceae que produz a enzima betalactamase, por isso é conhecida como *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase (KPC)*. Além disso, é encontrada em ambientes hospitalares, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva e acomete pacientes imunodeprimidos, através de várias portas de entrada ao organismo humano, como sondas vesicais, cateteres venosos centrais, tubos orotraqueais, cânulas de traqueostomia, lesões por pressão, sítio cirúrgicos (KRAPP *et al.*, 2017; AGUIAR *et al.*, 2020).

Nesse sentido, as lesões de pele por pressão (LPPs) caracterizadas pela descontinuidade e interrupção da estrutura normal da pele, por pressões ou força de cisalhamento, apresentam-se como uma lesão aberta, sem barreira protetora predisposta a contaminação imediata, podendo ser colonizada pela microflora do hospedeiro ou pelos micróbios do ambiente, expondo um meio ideal para proliferação de microrganismos patogênicos, que após sua entrada desenvolvem e originam processos infecciosos, como a *Klebsiella pneumoniae* em ambiente de UTI (CARDOSO,2015; WERT, *et al.*,2020).

Dessa maneira, a principal complicação das lesões de pele é a infecção, que associada a fatores de risco como o aumento da idade, inconsciência, incontinência urinária e/ou intestinal, estado nutricional deficiente, diabetes mellitus, paralisia e doenças cardiovasculares determinam a morbidade e mortalidade da patologia (WERT *et al.*, 2020).

Com relação ao seu tratamento existe uma gama de abordagens, objetivando a eliminação da pressão sobre a ferida, limpeza, controle da infecção, regeneração tecidual e apoio nutricional, envolvendo as mais diversas áreas da saúde. Ademais, de maneira mais

específica, os tratamentos com propriedades antimicrobianas incluem curativos impregnados, pomadas, gel entre outros, explorando formas farmacêuticas que requeiram desde o uso tópico ao uso oral. Esses, por sua vez, envolvem o uso de antibióticos, o que requisita uma utilização mais cautelosa, pois o uso indiscriminado de antibióticos é um dos motivos para o difícil tratamento das feridas, que implica no aumento de bactérias resistentes a antibióticos e bactérias multiresistentes (KUFFLER, 2015; NORMAN, *et al.*, 2016; MARIANO; BERRETA, 2019).

Então as LPPs são uma das preocupações atuais em hospitais e serviços de atendimento ao paciente, pois a resistência antimicrobiana dificulta a terapêutica e por consequência aumenta o risco de morbimortalidade (MARIANO; BERRETA, 2019). Diante desse cenário, é reconhecida uma necessidade de desenvolvimento de novas terapias farmacológicas ou potencialização das terapias já existentes para tratamento antibacteriano com baixa ou nenhuma resistência.

Assim, há estudos que exploram o uso de compostos medicinais à base de plantas, como a curcumina de açafrão, aloesina de aloe vera, timol de tomilho no tratamento das LPPs (ABURAYAN *et al.*, 2020). Estudos demonstram que os terpenos são uma categoria importante de compostos derivados de plantas e podem interagir uns com os outros e com células bacterianas para aumentar ou diminuir os efeitos antibacterianos uns dos outros. E observaram que o eugenol, terpineol, carveol, citronelol, geraniol apresentaram atividade antibacteriana e associaram esse efeito a presença de grupos hidroxila (ZEGIN; BAYSAL, 2014).

Não somente, mas de forma mais específica, ao analisar os óleos essenciais do tomilho e orégano, derivados de plantas aromáticas, foi possível observar que o orégano é rico em carvacrol e timol, tem como óleo essencial o *Origanum vulgare* L. (OEO) que apresenta atividade sobre distúrbios digestivos, respiratórios ou dermatológicos, com efeitos antibacteriano, antifúngico, antiparasitário, antioxidante, anti-inflamatório e antitumoral. Enquanto o tomilho, da mesma forma, apresenta como principais constituintes o timol e o carvacrol, tem como nome científico *Thymus vulgaris* L. e seu óleo também apresenta atividade antimicrobiana (FOURNOMITI *et al.*, 2015; LEYVA-LÓPEZ *et al.*, 2017; LOMBREA *et al.*, 2020).

À vista disso, Santos (2018), preparou membranas de quitosana incorporadas com bioativos naturais, dentre eles o óleo de cravo e melaleuca com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana para potencial uso como curativo de lesões cutâneas. Sendo assim, observou que suas membranas possuem propriedades antimicrobianas com diferentes espectros de ação.

Portanto, a incorporação dos óleos essenciais de *Origanum Vulgare* L. (orégano) e de *Thymus Vulgaris* L. (tomilho) em membranas à base de quitosana, apresenta-se como uma

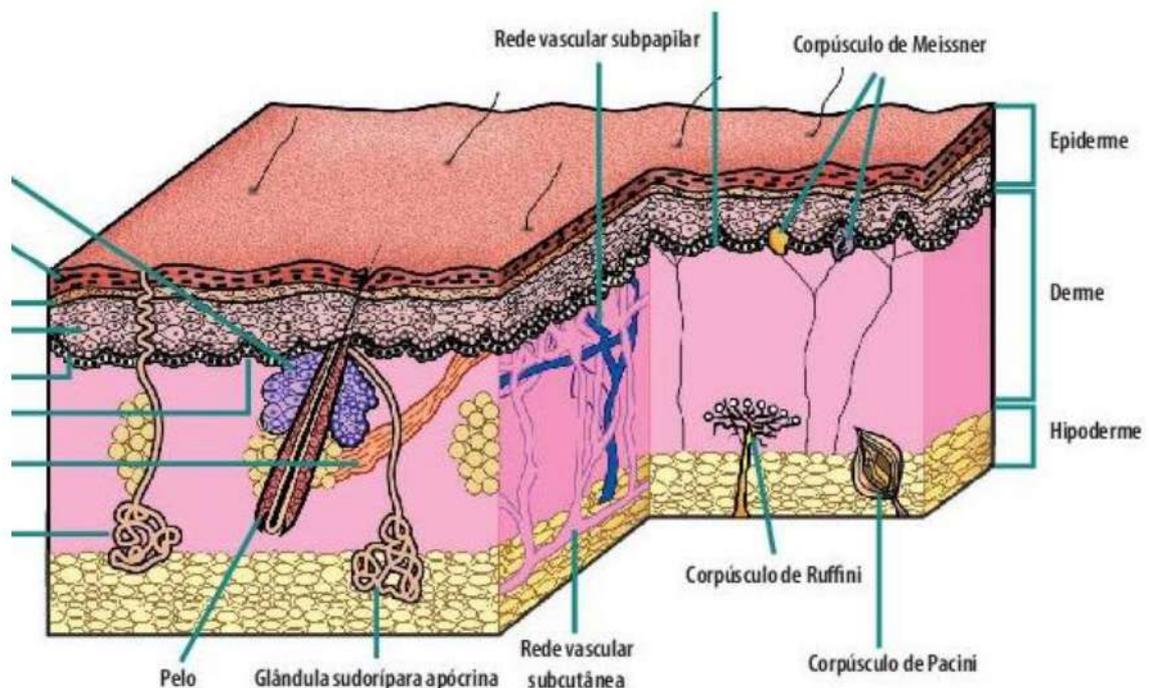
modalidade terapêutica promissora em relação ao seu potencial antimicrobiano para o tratamento de infecções associadas a lesões cutâneas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é comparar o potencial antibacteriano dos óleos essenciais de orégano e tomilho sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae*, e incorporá-los em membranas de quitosana para o tratamento de lesões por pressão.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A PELE

A pele se apresenta como o maior órgão do corpo humano, com uma área de 1,5 a 2,0 metros quadrados e funciona como uma barreira física protetora com papel importante na homeostase, resguardando os órgãos externos e protegendo o corpo de patógenos, produtos químicos, agentes físicos e radiação ultravioleta. Subdivide-se em três camadas: Epiderme, derme e hipoderme (Figura 1) (BERNARDO; SANTOS; SILVA, 2019; HARRIS *et al.*, 2019).

Figura 1. Camadas da pele



Fonte: Sampaio; Rivitti (2018)

A epiderme, camada mais superficial da pele, por sua vez, subdivide-se em outras 5 camadas: estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato germinativo. É responsável pela função de barreira, termorregulação, defesa imunológica, possui enzimas desintoxicantes de radicais livres e moléculas antioxidantes, equilíbrio da perda de água, entrada por mecanorreceptores e mecanismos endócrinos e metabólicos e, ainda, expressam uma ampla gama de moléculas, incluindo citocinas, fatores de crescimento e receptores (VOLLMER; WEST; LEPHART, 2018).

A derme sustenta a epiderme e é composta por fibrócitos que sintetizam as proteínas das fibrilas, colágeno e elastina, responsáveis pela sustentação do tecido. É subdividida em: derme papilar, que corresponde às papilas dérmicas e é constituída por tecido conjuntivo frouxo; derme reticular é constituída de tecido conjuntivo denso não modelado. Na derme papilar, a função das papilas é aumentar a zona de contato derme-epiderme, proporcionando maior resistência à pele. Já a derme reticular é responsável pela resistência e elasticidade da pele (MONTANARI, 2016).

E a hipoderme, a terceira camada da pele e mais profunda é composta em sua maior parte por tecido adiposo, contém os principais vasos e nervos, sendo responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas na qual se apoia, funcionando como amortecedor mecânico e barreira térmica. Contém os principais vasos e nervos e por isso também é responsável pelo suprimento da derme (PINHEIRO, 2016).

A pele, na condição de órgão externo, em contato direto com o meio e seus elementos, é colonizada por uma comunidade diversificada e complexa de microrganismos comensais e patogênicos que inclui bactérias, vírus, fungos e ácaros. Gerencia as interações com essa comunidade microbiana diversificada por meio de várias estratégias de defesa imunológica. Além disso, a composição dessa microbiota residente também varia entre os locais da pele e ademais, tem o meio imunológico da pele também adaptado exclusivamente para cada área da pele, e dessa maneira influenciando a capacidade de resposta a patógenos (KOBAYASHI; NAIK; NAGAO, 2019; LI *et al.*, 2021).

Então as defesas contra alterações da pele dependem da continuidade da estrutura normal, bem como da presença da microbiota da pele que é considerada essencial para a homeostase e função de barreira. Assim, o comprometimento de alguma dessas funções pode resultar em alterações patogênicas, incluindo lesões por pressão (NOWICKI *et al.*, 2017).

2.2 LESÕES POR PRESSÃO

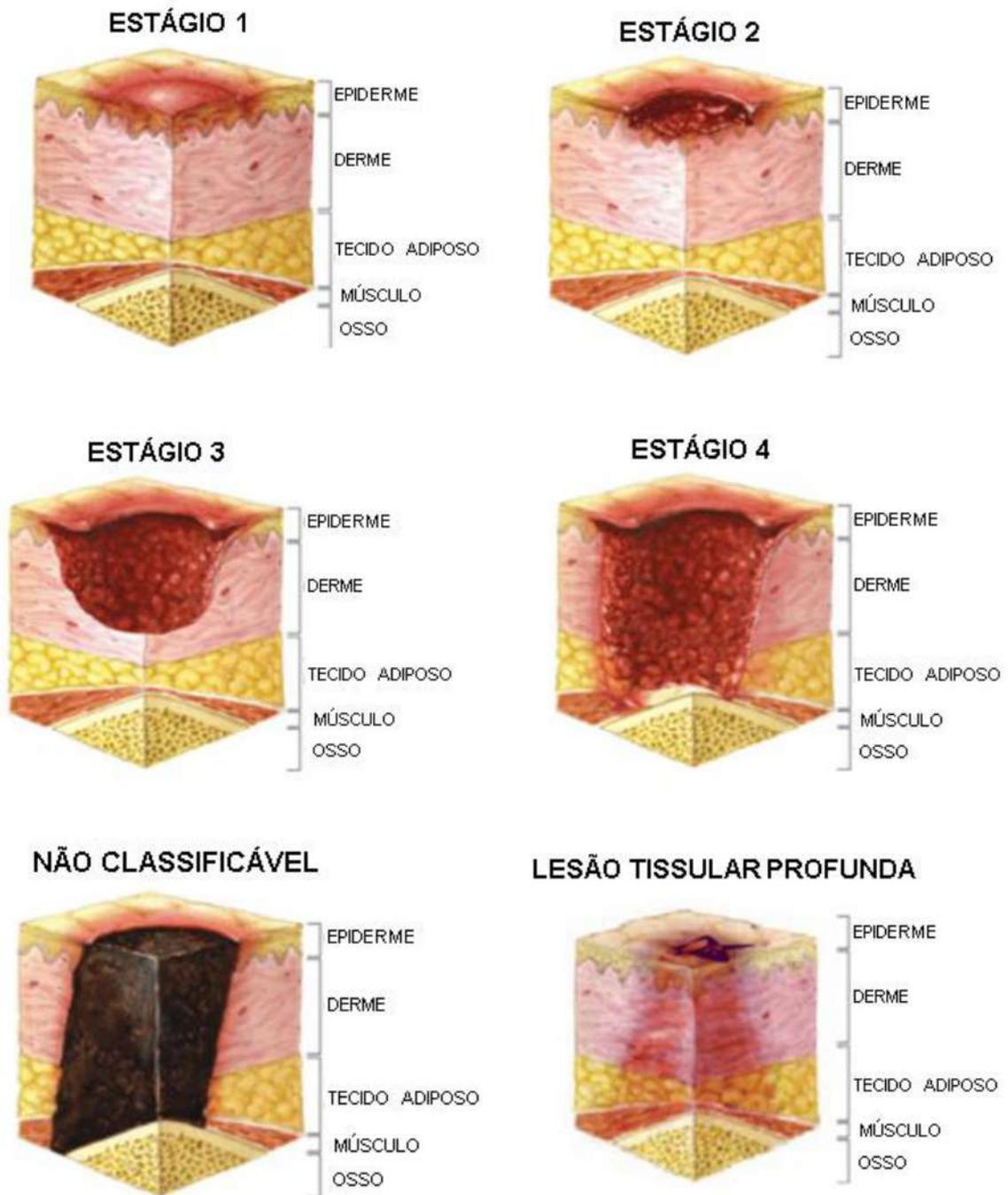
As lesões por pressão (LPPs) são danos localizados na pele e/ ou tecidos moles, geralmente sobre uma proeminência óssea, de etiologia isquêmica e estão relacionadas a lesões complexas e não traumáticas. São caracterizadas pela descontinuidade e interrupção da estrutura normal da pele, por pressões ou força de cisalhamento. Apresentam-se como uma lesão aberta, sem barreira protetora predisposta a contaminação imediata, podendo ser colonizada pela microflora do hospedeiro ou pelos micróbios do ambiente, expondo um meio

ideal para proliferação de micro-organismos patogênicos, que após sua entrada desenvolvem e originam processos infecciosos (JEKINS *et al.*, 2019; WERT *et al.*, 2020).

As LPPs receberam essa denominação, em 2016, quando o National Pressure Ulcer Advisory Panel (NPUAP) anunciou a mudança na terminologia Úlcera por Pressão para Lesão por Pressão e a atualização da nomenclatura dos estágios do sistema de classificação que subdivide as LPPs em estágios de acordo com profundidade e comprometimento da área (CALIRI *et al.*, 2016).

2.2.1 Classificação das lesões por pressão

As lesões por pressão podem ser classificadas pelo uso de estadiamento que considera a extensão da perda de tecido e sua aparência física. O National Pressure Ulcer Advisory Panel (NPUAP), uma organização norte-americana, sem fins lucrativos, dedicada à prevenção e ao tratamento de lesões por pressão, que dispõe de autoridade para emitir recomendações para o desenvolvimento de políticas públicas, educação e pesquisa voltadas à melhoria dos resultados na prevenção e tratamento das lesões por pressão, estabeleceu uma classificação por estágios das LPPs (Figura 2) (NPUAP, 2014; CALIRI *et al.*, 2016).

Figura 2. Estadiamento das LPPs

Fonte: NPUAP (2016)

Dessa forma, as lesões por pressão podem ser de estágio 1, no qual a pele está íntegra com eritema que não embranquece, com mudanças na sensibilidade, consistência e/ou temperatura. LPP de estágio 2 ocorre perda da pele em sua espessura parcial com exposição da derme, apresentando leito de ferida viável com coloração rosa ou vermelha, úmida e pode apresentar uma bolha intacta ou rompida, sem tecido adiposo e profundo visíveis. Já as LPPs

de estágio 3 apresentam perda da pele em sua extensão total, podendo visualizar a gordura, tecido de granulação e lesão com bordas enroladas. Além disso, é possível visualizar esfacelo e/ou escara. Enquanto isso no estágio 4 ocorre perda da pele em sua espessura total e perda tissular com exposição e palpação direta da fáscia, músculo, tendão, ligamento, cartilagem ou osso. Ocorrem, frequentemente, lesões com bordas enroladas (epíbole), descolamento e/ ou tuneis (OLIVEIRA; HAACK; FORTES, 2017).

E quando não é viável classificar a lesão em nenhuma das categorias anteriores, ela recebe a classificação de lesão por pressão não classificável que ocorre quando há perda da pele em sua espessura total e perda tissular não visível pois o esfacelo ou escara recobre a lesão e não permite visualização, sendo necessário a remoção da esfacela ou da escara. E por fim, ainda se tem as lesões por pressão tissular profunda, na qual observa-se uma descoloração em vermelho escura, marrom ou púrpura, resulta de pressão tissular intensa e/ou prolongada e de cisalhamento na interface osso-músculo, que pode evoluir e apresentar a extensão atual da lesão ou resolver sem perda tissular (EDSBERG *et al.*, 2016; OKAMOTO *et al.*, 2021).

2.2.2 Fatores de risco associados a lesões por pressão

As lesões por pressão representam complicações de saúde para o paciente, para os profissionais e cuidadores responsáveis pelo tratamento. Dessa maneira, conhecer os fatores de risco e etiologia dessas lesões pode colaborar para a prevenção e ou tratamento ideal para o paciente. Portanto, uma revisão publicada por Chung *et al.* (2022) abordou fatores de risco categorizados em dois domínios: condição limite mecânica (domínio 1) e suscetibilidade e tolerância do indivíduo (domínio2).

No domínio 1 observam-se fatores de risco como o tamanho do corpo, a fricção, pressão de interface, imobilidade e variáveis de estado mental ou distúrbios neurológicos. Para a análise do tamanho do corpo é considerado o IMC do paciente e observa-se na literatura que o baixo IMC é um preditor de desenvolvimento de lesões por pressão, pois pacientes que apresentaram baixo IMC estavam relacionados ao aparecimento de LPPs, nesse caso observa-se que o cuidado quanto ao equilíbrio nutricional como um todo do paciente pode ser considerado uma estratégia de prevenção para o desenvolvimento de LPPs (EGLSEER; HODL; LOHRMANN, 2019; COX; SCHALLOM, 2021).

Ainda do domínio 1, analisando a pressão de interface que se refere à pressão aplicada através de superfícies específicas, como colchões, camas ou espumas, apresenta-se como fator de proteção para o desenvolvimento de LPPs para alguns autores e para outros como uma

abordagem indiferente a prevenção; no caso de fatores de proteção, observa-se que o reposicionamento do paciente pode ser uma estratégia preventiva, principalmente nos casos de pacientes que apresentam estadia prolongada ao leito, sendo essa estadia um fator de risco ao desenvolvimento das LPPs (ALDERDEN *et al.*, 2017; HAN; KANG; KIM *et al.*, 2020; SHI, *et al.*, 2021).

E considerando outras interfaces, como os equipamentos do tipo respiradores utilizados por meio de máscaras e demais equipamentos e EPIs utilizados pelos pacientes, esses também foram classificados como fatores de risco ao desenvolvimento de LPPs (JIANG; LIU; WEI *et al.*, 2020).

Já no domínio 2 foram incluídas as seguintes variáveis: idade, gênero, etnia, valores laboratoriais, estado da pele. Com relação a idade observa-se na literatura uma maior predisposição ao desenvolvimento de LPPs associada a uma maior idade, da mesma maneira, foi observado um maior risco associado ao gênero masculino (HAHNEL *et al.*, 2017; LANGEMO *et al.*, 2021).

Dos valores laboratoriais, incluídos no domínio 2, observam-se a albumina, hemoglobina e anemia, bem como a nutrição de forma geral associadas ao desenvolvimento de LPPs quando estão abaixo dos parâmetros de normalidade (NOWICKI *et al.*, 2017).

Além desses fatores acima citados, o estado de saúde e diagnóstico do paciente também foram variáveis analisadas porém não apresentaram significância; e o estado geral da pele, considerando a hidratação, apresentou a pele seca como preditora ao desenvolvimento de LPPs; e a perfusão tecidual que associada a patologias como diabetes, doenças cardiovasculares, pneumonias e outras doenças respiratórias, que reduzem a perfusão tecidual apresentaram resultados significativos para o desenvolvimento de LPPs (CHEN *et al.*, 2017).

Por fim, de maneira ainda mais específica, ao se observar o cenário de Unidades de Terapia Intensiva (UTI), independente da categorização dos domínios, foram relatados na literatura as seguintes variáveis associadas a ocorrência de lesão por pressão: estar acamado com menor mobilidade; desnutrição; inconsciência; capacidade limitada de reação; sensibilidade a dor reduzida; idade avançada acrescida de comorbidades crônicas associadas; envelhecimento da pele; utilização de suporte de órgãos como ventilação mecânica e/ou terapia de substituição renal, permanência nas UTI por um período superior a 12 dias. Desse modo tomando o paciente de UTI mais vulnerável ao desenvolvimento de LPPs. (LABEAU *et al.*, 2021).

Dessa maneira é possível observar que os fatores associados ao desenvolvimento de LPPs podem ser intrínsecos e não modificáveis, bem como extrínsecos e modificáveis e identifica-los e aborda-los é uma importante medida de prevenção e tratamento.

2.2.3 Fisiopatologia das lesões por pressão

As LPPs são caracterizadas pela descontinuidade e interrupção da estrutura normal da pele, ocasionadas por pressões e/ou força de cisalhamento, ou ainda relacionado a um dispositivo médico. Sua patogênese envolve mecanismos que tem como componentes a isquemia de reperfusão, a alteração da drenagem linfática, a deformação celular e apoptose (DALGLEISH *et al.*, 2020).

A isquemia de reperfusão ocorre devido a obstrução ou oclusão da microcirculação decorrente da pressão mecânica externa, e resulta em fosforilação oxidativa mitocondrial com uma baixa produção de ATP, e ativação de leucócitos, culminando em inflamação. Além disso, a isquemia causa a hipoxemia que provoca o aumento de morte celular, liberação de metabólitos tóxicos como a ciclooxigenase 2 (COX-2) e interleucina 6 (IL-6), que, por sua vez, estimulam neutrófilos e macrófagos para liberar mais citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 8 (IL-8), quinase e proteína quinase que perpetuam o ciclo inflamatório (COX; SCHALLOM, 2021; GARCÍA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2022).

Dessa maneira, o mecanismo de isquemia de reperfusão pode ser classificado em três tipos, o agudo que ocorre com a presença de uma doença crítica, como choque séptico; o crônico, por sua vez ocorrendo na presença de um estado de doença crônica em curso, como demência; e por fim, o isquêmico de estágio final que ocorre no final da vida. Esses tipos podem ser considerados por alguns autores como mecanismos etiológicos para subdivisão dos diversos tipos de lesão cutânea, e para outros como uma sequência de eventos que tendem a se desenvolver e que podem se sobrepor (NIEMIEC *et al.*, 2020).

Ainda, sobre os mecanismos patogênicos tem-se a alteração da drenagem linfática, que por sua vez, é decorrente da deformação mecânica e está associada a obstrução linfática e venosa implicando em redução na depuração de metabólitos tóxicos, excesso de líquido intersticial, manutenção do infiltrado de leucócitos e baixa depuração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas, corroborando para sustentação da resposta inflamatória e morte celular (GRAY; VOEGELI; BADER, 2016).

Já a deformação celular e apoptose decorrentes da carga aplicada externamente, resultam na distorção em nível celular e tecidual que prejudica a viabilidade celular por

deficiências na permeabilidade da membrana plasmática e depuração anormal de oxigênio em miócitos e tecidos moles, além de destruição do citoesqueleto e morte celular (WU *et al.*, 2016).

Assim, pela sustentação da sinalização inflamatória e com a restauração do fluxo sanguíneo ocorre um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estresse oxidativo que promovem um fenótipo pro-inflamatório. Por fim, somada a inflamação crônica com a desregulação imunológica, observa-se uma alteração no processo de cicatrização normal, caracterizado pelas fases de inflamação, proliferação e remodelação, de forma que as lesões por pressão permanecem na fase inflamatória e apresentam cicatrização prejudicada (VAN DAMME *et al.*, 2020).

Abaixo é possível observar na Figura 3 o fluxograma relacionando os componentes da fisiopatologia das LPPs.

Figura 3. Fluxograma dos componentes da fisiopatologia das lesões por pressão



Fonte: Adaptado de Dalgleish *et al.*, 2020; Niemiec *et al.*, 2020; García-Fernández *et al.*, 2022.

2.2.4 Complicações cicatriciais e infecção das LPPs

Sabe-se que a pele é colonizada por muitas espécies de microrganismos benéficos, neutros e patogênicos, incluindo bactérias e fungos. E as alterações na microbiota cutânea estão relacionadas a ocorrência de LPPs e infecções, especialmente em pacientes hospitalizados (TAGLIARI, 2019).

Além disso, como visto no processo fisiopatológico das LPPs, observamos uma perpetuação da fase inflamatória no processo de cicatrização das lesões cutâneas, dessa forma apresentando uma cicatrização prejudicada (VAN DAMME *et al.*, 2020).

Por sua vez, a cicatrização consiste em um processo celular dinâmico caracterizado pela transição oportuna da fase inflamatória para a fase proliferativa que envolve eventos moleculares e bioquímicos como: a redução do número de neutrófilos na lesão, a alteração fenotípica dos macrófagos de inflamatório para reparador, deposição de colágeno e revascularização, facilitando o fechamento da ferida e objetivando a reconstituição tecidual. No entanto, complicações nas lesões cutâneas podem ocorrer e esse processo pode sofrer alterações e além de permanecer na fase inflamatória e resultar em lesões por pressão, por exemplo, é possível sofrer alterações na sua microbiota e tornar-se uma lesão com complicações infecciosas (GOMES *et al.*, 2022).

Ademais, alguns fatores de risco, como a presença de comorbidades a exemplo da diabetes, a idade, cuidados de higiene pessoal, imobilidade, hospitalização, associados ao desenvolvimento de LPPs apresentam interferência sobre a saúde da pele e somados a resposta imune alterada resultam em modificações das comunidades de microbiomas, aumentando a susceptibilidade ao desenvolvimento de LPPs infectadas. A microbiota das LPPs é geralmente polimicrobiana e a permanência e mistura depende da localização, duração e estágio da LPPs. Essas infecções são vistas como resultado do comportamento oportunista do microrganismo diante de uma LPP de estágio 2 ou acima (HILL *et al.*, 2014; DANA; BAUMAN, 2015).

As LPPs, feridas diabéticas, queimaduras e demais lesões cutâneas infeccionadas estão associadas com uma variedade de cepas bacterianas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, e *Pseudomonas aeruginosa*. Muitas dessas cepas podem formar biofilmes, que podem ser compostos de uma ou várias linhagens incorporadas em uma matriz extracelular composta de carboidratos, DNA extracelular e proteínas. E essa estrutura complexa confere ao biofilme resistência a antibióticos e respostas imunes e se estas infecções persistem, podem levar à bacteremia, à sepse, celulite, fascite, endocardite, osteomielite, em casos mais extremos, à óbitos (TAGLIARI, 2019; SHIBATA *et al.*, 2021).

No caso da LPPs infeccionadas, foi relatado na literatura a correlação da região anatômica com o agente patogênico, e observa-se uma prevalência de colonização pela *S. aureus* e *Enterococcus* não classificado na região sacral; *S. aureus*, *P. aeruginosa* nos tomozelos e calcanhares; *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus* no sacro; e *Klebsiella pneumoniae* na região isquiática (GOMES *et al.*, 2022).

2.3 KLEBSIELLA PNEUMONIAE

O gênero *Klebsiella* foi definido por sequenciamento do ácido desoxirribonucleico (DNA) e permitiu a identificação de cinco espécies: *K. oxytoca*; *K. planticola*; *K. terrigena*, *K. mobilis* e *K. pneumoniae*. Esta última é subclassificada em três subespécies: *Klebsiella pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subespécie *ozaenae* e *Klebsiella pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis*. Entre as três subespécies de *Klebsiella*, *K. pneumoniae* é a mais frequente (MORAES *et al.*, 2013).

A *Klebsiella pneumoniae* (Kp) é um bacilo Gram-negativo, da família *Enterobacteriaceae*, aeróbio facultativo, mas com melhor crescimento em condições aeróbias, não esporulado e com tamanho variando de 0,3 a 1 μ de diâmetro e 0,6 a 6 μ de comprimento, é imóvel, produz colônias grandes e gomosas quando cultivadas em placas com nutrientes. Pode ser encontrado em locais como água, solo, plantas e esgoto (MACIEL; DE MATTOS, 2013). E sua colonização em seres humanos provavelmente ocorre por contato com as diversas fontes ambientais e pode ser encontrado colonizando a orofaringe e fezes de pessoas saudáveis, ou como um oportunista no organismo de pessoas imunocomprometidas, levando aos quadros de infecção (ALMEIDA *et al.*, 2013; SEIBERT *et al.*, 2014).

Ademais, destaca-se por ser produtora de uma enzima denominada carbapenemase, e por isso recebe também como denominação a sigla KPC – *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*. Portanto, apresenta resistência aos antibióticos da classe dos carbapenêmicos: Meropenem, Ertapenem, Imipenem, além de ser capaz de inativar agentes β -lactâmicos, como cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos. Além disso, sabe-se que a KPC apresenta um potencial alto de disseminação, sendo a *Klebsiella pneumoniae* uma bactéria com alta capacidade de transferir seu material genético, e conseqüentemente, seus genes de resistência, o que está associado a dificuldade de controle de infecções envolvendo essa bactéria (CUNHA, 2014; NIRWATI *et al.*, 2019).

Na década de 1970, a *Kp* se tornou uma das causas mais importantes de doenças oportunistas associadas à saúde. Correlacionada a doenças como a pneumonia, infecções no trato urinário, vias biliares inferiores, infecções em locais de feridas cirúrgicas, bem como bacteremia ou sepse. Os pacientes mais vulneráveis são recém-nascidos e idosos, especialmente aqueles que são imunocomprometidos. E sua fácil disseminação em ambiente hospitalar, como também, os surtos provocados por ela, são de difícil controle e levam a mortalidade de muitos pacientes, o que gera uma grande preocupação (MARTIN; BACHMAN, 2018; ARATO *et al.*, 2021).

Portanto, o conhecimento de agentes sensibilizantes da KPC é de suma importância, afim de auxiliar na redução dos índices de morbimortalidade ligado às infecções, além de limitar sua disseminação (NIRWATI *et al.*,2019).

Mattingly *et al.* (2020) observaram que a identificação e desenvolvimento de adjuvantes antibióticos representam uma alternativa a resistência e disseminação bacteriana. E, uma vez que, as substancias químicas introduzidas entre 1981 e 2002, com finalidade antimicrobiana, apresentam estruturas com características químicas parecidas ou semelhantes com os produtos naturais, hipotetizaram que as coleções de produtos naturais purificados, de outros produtos ou de extratos, podem conter atividade adjuvante aos antimicrobianos atualmente utilizados. Então, rastreamos na biblioteca *Product Library Set IV*, e encontramos que a prodigiosina e a novobiocina em associação com a colistina foram capazes de reduzir a CIM da colistina para as cepas de *A. baumannii* e *K. pneumoniae*.

2.4 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE MEDICAMENTOS

Historicamente, a maior parte dos fármacos foi originada a partir de produtos naturais, extraídos de tecidos de plantas terrestres, organismos marinhos ou microrganismos. Um extrato bruto de alguma dessas fontes normalmente contém novos compostos químicos com estruturas diversas, e essa enorme variabilidade química estrutural e funcional é resultado de uma flexibilidade metabólica de adaptação desses produtos a inúmeras situações de estresse ambiental (agentes químicos, físicos e biológicos), e conseqüentemente constitui uma fonte renovável de metabólitos especializados (RODRIGUES, 2018).

Esses produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos passados. E acredita-se que a busca por alívio de dor e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. Dessa maneira, as propriedades etnofarmacológicas desses produtos foram utilizadas como fonte primária de medicamentos para a descoberta de drogas. E a investigação das plantas resultou no isolamento de muitos produtos naturais que se tornaram produtos farmacêuticos bem conhecidos (AMARAL,2019).

No presente momento, ainda se tem cerca de 50% dos fármacos disponíveis como derivados ou inspirados de produtos naturais. E com a utilização de tecnologias e abordagens integradas para química combinatória e síntese paralela, por exemplo, são produzidos muitos compostos e submetidos a avaliação para posterior desenvolvimento (TRIVELLA *et al.*,2020).

Ademais, as fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico. O Brasil possui a maior diversidade de espécies de plantas do mundo, entretanto, se observa uma quantidade reduzida de análises com relação as características biológicas, bem como de estudos fitoquímicos (FERREIRA *et al.*,2011).

Verifica-se que os produtos naturais podem ser empregues de diversas formas: sem processamento industrial (por exemplo, infusões de plantas medicinais), em preparações galênicas simples (por exemplo, como tinturas e extratos fluidos), em medicamentos fitoterápicos (por exemplo, vegetais ou frações dos mesmos, quimicamente caracterizados e padronizados, inseridos em formas farmacêuticas), ou substâncias puras (como por exemplo a penicilina que tem origem microbiana). Estes produtos podem até mesmo serem usados como estrutura de base para obter moléculas farmacologicamente ativas, como recurso a processos de síntese parcial, com o objetivo de melhorar as propriedades farmacológicas, ou como modelos moleculares para a síntese total de novos compostos (LOTUFO,2015; RODRIGUES, 2018).

Diante desse cenário, são identificados estudos empregando um componente de forma isolada, o produto como um todo, uma extração ou a incorporação desses produtos naturais em biomateriais, por exemplo, para fins medicinais. De modo que são analisadas seus componentes, estruturas, propriedades fitoquímicas, bem como suas atividades *in vitro* e *in vivo*, a exemplo de estudos com o óleo essencial de orégano como agente antimicrobiano (FOURNOMITI *et al.*,2015; ABURAYAN *et al.*, 2020; LOMBREA *et al.*,2020).

Em referência ao uso de produtos naturais com atividade antibacteriana, estudos demonstram que os terpenos, principais compostos dos óleos essenciais, são uma categoria importante dentre os produtos derivados de plantas e podem interagir uns com os outros, bem como com as células bacterianas para aumentar ou diminuir os efeitos antimicrobianos uns dos outros. Por fim, observaram que o eugenol, terpineol, carveol, citronelol, geraniol apresentaram atividade antibacteriana e associaram esse efeito a presença de grupos hidroxila (ZEGIN; BAYSAL, 2014).

2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas aromáticas são excelentes fontes de produtos naturais por possuírem compostos bioativos que podem ser extraídos por diversos processos. Existe grande variedade

de plantas que são conhecidas e valorizadas por seu conteúdo de óleo essencial (OE), que por sua vez, consistem em misturas complexas de compostos voláteis presentes nessas plantas aromáticas (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Os óleos essenciais são vistos com amplas aplicações em microbiologia médica e clínica, botânica farmacêutica, indústrias de fragrâncias, bem como aromatizadores de alimentos e preservação. E são conhecidos por possuírem propriedades antimicrobianas contra bactérias e fungos multirresistentes, devido a um amplo espectro de atividade biocida (KOZICS *et al.*, 2019).

Ainda, tem-se que os OEs são constituídos principalmente por terpenóides, terpenos, compostos alifáticos e aromáticos. Geralmente, sendo caracterizados por um alto nível de componentes fenólicos, como o carvacrol, e timol que tem importantes propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e antioxidante (SEOW *et al.*, 2014).

Além disso, sabe-se que a característica dos OEs é sua hidrofobicidade, que os tornam capazes de interagir com os lipídios da membrana celular bacteriana, perturbando sua estrutura, de forma que causa expansão da membrana, aumenta a fluidez e a permeabilidade, degrada as proteínas incorporadas, inibe a respiração, e altera os processos de transporte de íons. Dessa maneira, quebrando a homeostase e tornando a bactéria susceptível a morte celular (ROSTRO-ALANIS *et al.*, 2019).

À vista disso, os óleos essenciais apresentam efeitos imediatos sobre a membrana de micro-organismos Gram-positivos entrando em contato diretamente com a bicamada fosfolipídica da membrana celular. Já, sobre os micro-organismos Gram-negativos que possuem uma membrana rica em lipopolissacarídeos tornando-a quase impermeável a compostos lipofílicos, os OEs atuam devido à presença de proteínas porinas em sua membrana externa, que cria canais suficientemente grandes que permitem a passagem de compostos de pequena massa molecular (SEOW *et al.*, 2014).

Portanto, OEs apresentam características correlacionadas com a atividade antibacteriana. E, de forma mais específica, OEs de orégano (OR) e tomilho (TO) demonstraram atividade antibacteriana e também antifúngica, antisséptica, antioxidante e anti-inflamatória. Logo, as combinações desses OEs mostram potencial em exibir efeitos sinérgicos, se não aditivos (SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017).

2.5. 1 Óleo essencial de orégano

Figura 4. Orégano- *Origanum vulgare*



Fonte: Herbário UniRIO (2022)

O orégano é uma erva pertencente à família *Lamiaceae* e sua principal espécie representativa é o *Origanum vulgare*. Etimologicamente, o nome *Origanum* vem do nome grego da planta (*origanon*), que deriva das palavras (*oros* = montanha) e (*ganos* = brilho, beleza), já que o orégano cresce em altitudes de 400-1.800m e lugares ensolarados (Figura 4) (SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017).

São em média 61 espécies e 17 gêneros pertencentes a seis famílias botânicas diferentes. *Verbenaceae* e *Lamiaceae* são as famílias mais conhecidas devido à sua importância econômica. Dentro da família *Lamiaceae* estão as plantas pertencentes aos gêneros *Origanum* e *Hedeoma*; enquanto os gêneros *Lippia* e *Lantana* pertencem à família *Verbenaceae*. As outras famílias são *Rubiaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Hedeoma patens*, *Lippia graveolens*, *Lippia palmeri*, *Lippia alba*, *Origanum dictamnus*, *Origanum hirtum*, *Origanum onites*, *Origanum vulgare* são alguns exemplos de espécies de orégano produtoras de OEs (LEYVA-LÓPEZ *et al.*, 2017).

O orégano tem sido usado como tempero alimentar desde tempos passados e apresenta concentrações de compostos variáveis de acordo com a espécie, época de colheita e fontes geográficas. Os principais compostos identificados nos diferentes OEs de orégano são os terpenos, geralmente monoterpenos e sesquiterpenos. E os principais terpenos identificados são o carvacrol e o timol, responsáveis pelo odor característico. E, também, apresenta compostos como o γ -terpineno, p-cimeno, terpinen-4-ol, linalol, β -mirceno, hidrato de trans-sabineno e β -cariofileno que presentes definem o seu quimiotipo (RODRIGUEZ-GARCIA *et al.*, 2016).

Estudos mostraram que o óleo de orégano apresentou atividade anti-patogênica e antioxidante em produtos como carnes e frutas, as vezes utilizado em combinação com revestimentos comestíveis para embalagem desses produtos (JAYASENA, 2013; ADAMEGALLEGOS; ANDRADE-OCHOA; NEVAREZ-MOORILLON, 2016).

Uma outra atividade observada com relação ao uso do OE de orégano está associada a inflamação. Essa, por sua vez, considerada uma resposta biológica normal do corpo em reação a danos nos tecidos, infecção e agentes químicos ou físicos. Na inflamação é desencadeado o aumento da produção de mediadores inflamatórios como prostaglandinas, enzimas, óxido nítrico (ON) e espécies reativas de oxigênio (EROS). Estudos apontam que o OE de orégano tem capacidade de exercer atividade anti-inflamatória pois é responsável pela redução de ON e EROS produzidos por células macrófagos, fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina (LEYVA-LÓPEZ *et al.*, 2016; HAN; PARKER, 2017).

Com relação a atividade antibacteriana e bacteriostática, o OE *Oreganum vulgare* foi eficaz na inibição do crescimento de todas as seguintes cepas bacterianas: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Shewanella putrefaciens*, *Brochothrix thermosphacta* e *Pseudomonas putida*, com valores de CIM abaixo de 5 mg mL⁻¹, revelando assim atividade antibacteriana (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

De forma mais específica, estudos apontam que o óleo de orégano apresenta atividade sobre bactérias gram negativas como as *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *C. koseri* (AL-MARIRI; SAFI, 2014; SAKKAS *et al.*, 2016; KOZICS *et al.*, 2019). Ainda, são observados estudos combinando a aplicação do OE de orégano com sistemas de entrega de agentes antimicrobianos, como microemulsões, nanofibras e filmes de quitosana (LU *et al.*, 2021; SOBCZYK *et al.*, 2021; VLAIA *et al.*, 2021).

Nesse contexto, o óleo essencial de orégano tem forte potencial para ser usado como alternativa aos produtos químicos sintéticos antibacterianos.

2.5.2 Óleo essencial de tomilho

Figura 5. Tomilho- *Thymus vulgaris*



Fonte: Wikipedia (2022)

O tomilho pertence à família *Lamiaceae* (Figura 5), e foram identificadas em média 928 espécies do gênero *Thymus* na Europa, Norte da África, Ásia, América do Sul e Austrália. É uma planta aromática e medicinal, com espécies representativas o *T. serpyllum* (tomilho selvagem) e o *T. vulgaris* (tomilho comum). Esse último, o *T. vulgaris*, pode conter até 30 monoterpenos, resultando em uma composição química diversificada dos óleos derivados de plantas da mesma espécie, levando a diferentes quimiotipos (SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017).

Assim como no orégano, os compostos fenólicos, timol e carvacrol, são os seus principais componentes. Apresentando mais de 44% de fenóis, que em grande parte consiste em 41% de Timol e 3,6% carvacrol. Acredita-se que a extremidade hidrofóbica destes componentes interage com a membrana celular das bactérias, alterando sua permeabilidade para cátions como hidrogênio (H⁺) e potássio (K⁺). E esse descontrole no gradiente de íons leva as células bacterianas à morte (SATYAL *et al.*, 2016).

O óleo de tomilho é um dos 10 tipos de óleos essenciais mais comercializados em todo o mundo, e tem sua aplicação como conservante natural de alimentos, sendo utilizado como um aditivo aromático para uma variedade de alimentos e bebidas, além de produtos de higiene pessoal. Ainda, apresenta atividade antioxidante, efeitos antibacterianos e antifúngicos (DEL RÉ; JORGE, 2012).

Estudos mostraram que bactérias Gram negativas do tipo *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, e *C. koseri* são sensíveis ao óleo essencial de tomilho (OET), dessa forma, este apresenta efeito antibacteriano (KOZICS *et al.*, 2019). De mesmo modo, avaliando a atividade antibacteriana sobre cepas específicas, Oulkheir *et al.* (2017) observou que o óleo essencial de

tomilho apresentou atividade contra *E. coli.*, *Salmonella, spp.*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus grupo D*, e *S. aureus*.

Ainda, foi avaliada a atividade sinérgica do OE tomilho com o OE hortelã-pimenta e do ciprofloxacina como potenciais agentes antibiofilme sobre a *K. pneumoniae* e sugeriram que o OE de tomilho em conjunto com o OE hortelã-pimenta e do ciprofloxacina apresentam potencial aplicação para prevenir e/ou diminuir o limiar de resistência da *K. pneumoniae* para formação de biofilme (MOHAMED *et al.*, 2018).

Enquanto Vázquez-Ucha *et al.* (2020), analisaram a atividade sinérgica de variados tipos de OE, entre eles o de tomilho e de cravo em combinação com colistina. Então, através de testes de difusão em disco e da concentração inibitória fracionada necessárias para inibir o crescimento de *A. baumannii* e *K. pneumoniae* obtiveram que os OEs de tomilho e de cravo apresentaram os maiores níveis de atividade antimicrobiana.

Nesse contexto de atividade sinérgica, também foi possível observar um estudo que investigou os possíveis efeitos sinérgicos entre diferentes OEs selecionados e comercialmente disponíveis em conjunto com a gentamicina contra isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) e metalo- β -lactamase-1 de Nova Deli (NDM-1). E concluíram que o tomilho combinado a gentamicina apresenta efeito aditivo, dessa maneira podendo reduzir o uso de antimicrobianos de amplo espectro (KWIATKOWSKI *et al.*, 2018).

E, de forma isolada, considerando a inibição de biofilmes, outro estudo demonstrou que o tomilho (*Thymus vulgaris*) apresenta potencial para inibir a formação de biofilme bacteriano contra seis bactérias patogênicas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (MOHSENIPOUR; HASSANSHAHIAN, 2015).

Tendo em conta os estudos acima descritos, o óleo essencial de tomilho pode apresentar-se como produto natural antimicrobiano alternativo aos produtos químicos sintéticos antibacterianos.

2.6 CURATIVOS

A gestão de lesões cutâneas e o conhecimento científico sobre o processo cicatricial tem avançado significativamente. E associado a engenharia de materiais prosperam nas pesquisas clínicas, com a finalidade de desenvolver estratégias para elaboração de materiais adequados a curativos para o tratamento de lesões (STOICA, 2020).

Assim, o tratamento das lesões cutâneas é dinâmico e depende, da evolução das fases de cicatrização. Portanto, alguns aspectos devem ser considerados no momento da escolha do tipo de curativo: adequação à natureza, à localização e ao tamanho da ferida. E no presente momento, são inúmeras as opções de curativos existentes no mercado (SHI, 2020).

De acordo com a *Food and Drug Administration* – FDA, os curativos podem ser classificados como passivos convencionais e interativos ou bioativos, com base em sua natureza de ação, e em temporários e permanente conforme o caráter temporal, como pode ser observado no Quadro 1 (NICULESCU; GRUMEZESCU, 2022).

Quadro 1. Classificação e características dos curativos

CLASSIFICAÇÃO	CARACTERÍSTICAS
Curativos passivos ou inertes, também podem ser denominados de tradicionais	Atuam apenas como cobertura, não tem atividade antibacteriana, não mantém a umidade no leito da lesão e são propensos a aderir. Ex.: gaze, algodão absorvente e bandagens.
Curativo interativo	Podem ter ações sobre a regeneração da lesão e auxiliar nas etapas da cicatrização.
Curativos bioativo	Mantém as características do curativo interativo com a vantagens de entrega controlada de moléculas bioativas encapsuladas que auxiliam ou potencializam o processo cicatricial.
Curativos temporários	Promove proteção e estimula a cicatrização.
Curativos permanentes	Incorpora na pele regenerada do paciente

Fonte: Adaptado de Niculescu; Grumezescu, 2022

Outra classificação sugerida por Negut; Grumezescu; Grumezescu (2018), considera a formulação dos curativos e pode ser observada no Quadro 2.

Quadro 2. Classificação dos curativos segundo sua formulação

NATUREZA	FORMULAÇÃO	VANTAGENS/DESVANTAGENS
Inerte/ Passivo	Gaze	São fabricados em formas de bandagens, esponjas, secos e de baixa proteção, podendo grudar em feridas
Bioativos	Hidrocolóides	São semipermeáveis e semioclusivos, estimulam a angiogênese, pode envolver partículas hidroativas que incham com exsudatos formando um gel, o que facilita sua remoção. Pode ser aplicado em feridas com exsudato leve e pode ser citotóxico.
	Alginatos	Hemostáticos como resultado da liberação de íons de cálcio que auxiliam na

		coagulação, e altamente absorventes, útil no desbridamento de feridas descamadas. Uso limitado em feridas pouco exsudativas, causando ressecamento e deve ser trocado diariamente
	Colágeno	Apresentam-se como almofadas, géis, ou partículas e incentivam a formação e fixação de colágeno em feridas. São fáceis de aplicar, porém não são recomendados para lesões com necroses e queimadura de terceiro grau
	Hidrofibra	Curativos de fita ou almofada que absorvem exsudato e proporcionam um ambiente úmido em feridas profundas com risco reduzido de maceração da pele. Uma absorção de quantidade excessiva pode causar inchaço indesejável do curativo e resultar em perda de adesão
Interativo	Hidrogel	Reidrata feridas secas, alta capacidade de absorver grandes volumes de água dentro de sua rede polimérica, não irritante e não reativo, semi-oclusivos. Pode causar hidratação excessiva, tem propriedades mecânicas fracas
	Filmes semi-permeáveis	Semi permeável, poliuretano fino e transparente altamente elástico, podendo seguir qualquer contorno. Indicado para feridas superficiais, com pouco exsudatos, usado como camada adicional para hidrogeis e espumas
	Espumas semipermeáveis	Macio, de célula aberta, hidrofóbico, absorve grandes quantidades de exsudatos e mantém a umidade, reduzem o espaço morto. Pode causar ressecamento e formação de crostas

Fonte: Adaptado de Negut; Grumezescu; Grumezescu (2018).

Ainda, segundo Weller e Team (2019), existe uma classificação de acordo com as propriedades antimicrobianas dos curativos, conforme observa-se no Quadro 3:

Quadro 3. Classificação dos curativos de acordo com as propriedades antimicrobianas

CURATIVOS ANTIMICROBIANOS	
Curativos de prata	Apresentam-se como espumas, hidrofibras e hidrocoloides, eficaz na redução do tamanho da ferida, porém apresenta efeito citotóxico
Curativos de iodo	Apresentam-se por preparações a base de iodo, iodopovidona e iodo cadexomer, que tem efeitos antibacterianos e bacteriostáticos, são utilizados na prevenção e tratamento de infecções de feridas cirúrgicas, traumáticas, queimaduras e lesões por pressão.
Curativos de cloridrato de polihexametileno biguanida (PHMB)	Apresenta-se como gel tópico, solução tópica e impregnado em produtos para curativos. É antisséptico, não citotóxico, porém não é recomendado para gestantes no primeiro trimestre

Fonte: Adaptado de Weller e Team (2019).

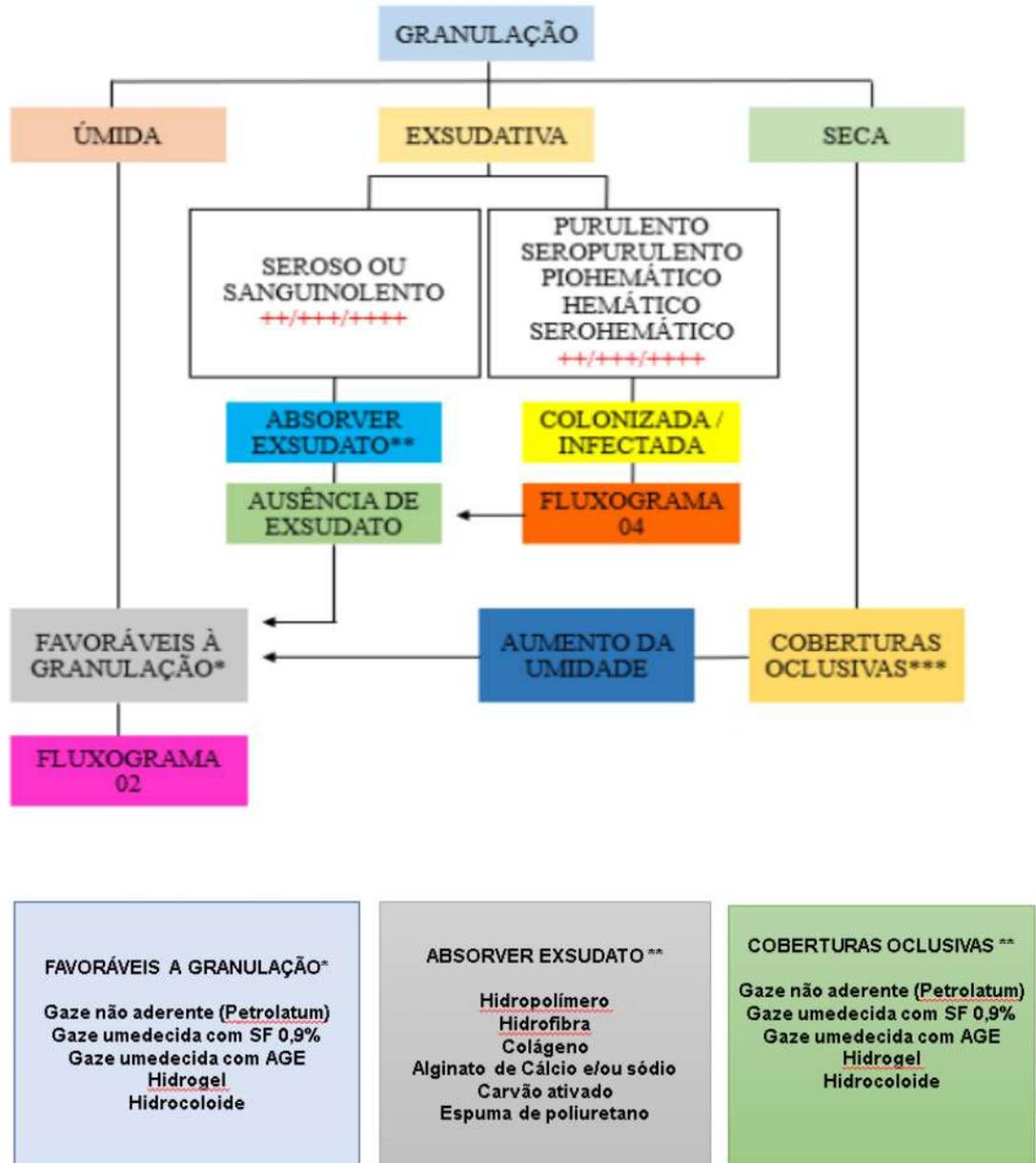
Como pode ser observado existem vários tipos de curativos e algumas características importantes devem ser consideradas na concepção de um curativo. Como, por exemplo, a aderência à ferida, a porosidade, a macroestrutura, as dimensões do curativo, suas propriedades mecânicas, a taxa de biodegradação e a muco adesividade (EULÁLIO; ALMEIDA; GONÇALVES; FOOK, 2019).

Dessa maneira observam-se alguns pré requisitos para se obter um curativo ideal: Absorver e conter o exsudato mantendo a ferida úmida e não macerada; Fornecer isolamento térmico, a fim de manter a melhor temperatura para cicatrização; Permitir a permeabilidade troca gasosa, mas não a bactérias; Otimizar o PH da ferida; Minimizar infecção e esfacelo excessivo; Evitar traumas na ferida com a retirada do curativo, portanto o curativo não deve aderir a lesão; Acomodar a necessidade de trocas frequentes de curativos, proporcionando alívio da dor; Ter boa tolerância dérmica; Favorecer a aplicação de medicação tópica; Menor custo (KUMIRSKA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2021).

Por conseguinte, para escolher os melhores curativos a fim de tratar as lesões cutâneas devem ser realizadas observações clínicas com relação ao tipo de tecido, estadiamento da lesão, quantidade de exsudato, presença de sangramento, sensibilidade à dor e presença de infecção (WESTBY *et al.*, 2017).

E, diante da variabilidade dos curativos e dessas observações clínicas acima relatadas, foi elaborado um fluxograma de tratamento das lesões por pressão, indicando cada tipo de curativo de acordo com a avaliação da lesão (Figura 6) (ABREU *et al.*, 2022).

Figura 6. Fluxograma para escolha de tratamento tópico



Fonte: Abreu *et al.*, (2022).

De modo consequente, e sabendo-se que um processo de reparo inadequado pode causar danos graves, como: perda de pele, início de infecção, com consequentes danos aos tecidos subjacentes e até mesmo sistêmicos devido ao ambiente biológico distinto e não estéril da lesão, e ao sistema complexo de cicatrização de feridas, especialmente no caso de ocorrência de feridas crônicas, em que os indivíduos frequentemente passam por tratamentos extensos e trocas regulares de curativos. Um curativo totalmente solúvel, não substituível ou não aderente, que

distribui os tratamentos no local da ferida de maneira precisa, pode melhorar os resultados terapêuticos (VIGANI *et al.*, 2019).

Curativos avançados devem apresentar um papel dinâmico no processo de cicatrização de feridas, seja auxiliando na remoção de tecidos necróticos, prevenindo/tratando infecções instaladas, ou ambos. Nesse sentido, os curativos confeccionados a partir de biomateriais, tais como a quitosana, e incorporados com óleo essencial podem ser valiosos no manejo de infecções locais onde seriam necessárias altas doses de concentração de antibióticos (NEGUT; GRUMEZESCU; GRUMEZESCU, 2018).

A quitosana, tem sido amplamente utilizada em aplicações médicas, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana e propriedade hemostática; vários curativos à base de quitosana já foram produzidos, e já há estudos incorporando óleos essenciais a quitosana para elaboração de curativos (TOMAZ, 2017; SANTOS, 2018).

2.7 BIOMATERIAIS

Os biomateriais podem ser definidos como materiais sintéticos ou naturais projetados para utilização no organismo por um período de tempo. Esses materiais podem ser usados em conjunto ou como parte de um sistema de forma que direcione e controle interações com componentes dos sistemas vivos, em procedimentos diagnósticos ou terapêuticos, no meio biológico. Tem como objetivo fundamental melhorar a saúde humana, restaurando a função dos tecidos vivos naturais e órgãos do corpo humano, podendo apresentar a capacidade de regeneração tecidual e melhora da inflamação (EULÁLIO *et al.*, 2019).

O campo dos biomateriais compreende quatro principais classes de materiais: poliméricos, cerâmicos, metálicos e os compósitos. Estes materiais já são amplamente utilizados e disponibilizados em diferentes formatos e formas de apresentação, tais como adesivos, géis, cilindros, discos, microesferas, grânulos, filmes, membranas, borrachas, fibras, espumas e outros. Com aplicabilidade em variadas especialidades da saúde como na ginecologia, na obstetria, na oftalmologia, na ortopedia, na odontologia e na fisioterapia (SANTOS; MARINHO; MIGUEL, 2013).

Ao se intencionar o uso de um biomaterial para confecção de curativo, ele deve respeitar alguns pré-requisitos como biocompatibilidade, biodegradabilidade, com taxa semelhante à de crescimento do tecido original, capacidade de entrega de fatores de crescimento, e possuir

propriedades mecânicas adequadas com formatos apropriados (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Em vista disso, os biopolímeros abrangem um tipo de biomaterial com propriedades biodegradáveis e biocompatíveis. São derivados de polissacarídeos, proteínas, lipídeos, e/ou macromoléculas complexas. Possuem a capacidade de mimetizar a matriz extracelular, por isso tem sido utilizado em aplicações de engenharia de tecidos, para regeneração tecidual (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019).

Esses biopolímeros possuem grupos funcionais como agrupamentos amino, grupos carboxílicos e hidroxilas, que os torna passíveis de modificações químicas e enzimáticas influenciando na sua interação com outras moléculas. Essas propriedades permitem a obtenção de uma variedade de produtos como, por exemplo, hidrogéis e scaffolds, que podem ser preparados por meio de automontagem ou usando técnicas de reticulação para simular as propriedades do tecido natural (JOYCE *et al.*, 2021).

Os scaffolds, por sua vez, apresentam-se como uma matriz biocompatível com porosidade, estrutura tridimensional, degradabilidade, propriedades mecânicas e de transporte de massa apropriados, assemelhando-se à matriz extracelular. Ademais, são altamente absorventes, com capacidade de estimular o crescimento e migração celular. Devido a essas propriedades e sua abundância, os polímeros naturais apresentam bastante visibilidade na área da regeneração tecidual (SILVA *et al.*, 2021).

No grupo dos polímeros naturais com atividade antimicrobiana a quitosana aparece como um dos mais promissores, exibe uma natureza policatiônica que torna um sistema ideal para entrega de glicosaminoglicanos aniônicos, fatores de crescimento, citocinas, além de liberação de medicamentos (HEMMINGSSEN; SKALKO-BASNET; JORAHOLMEN, 2021). Além disso, a quitosana pode ser usada em aplicações biomédicas como curativos em forma de scaffolds, pois demonstra atividade hemostática e antibacteriana (MUXIKA *et al.*, 2017).

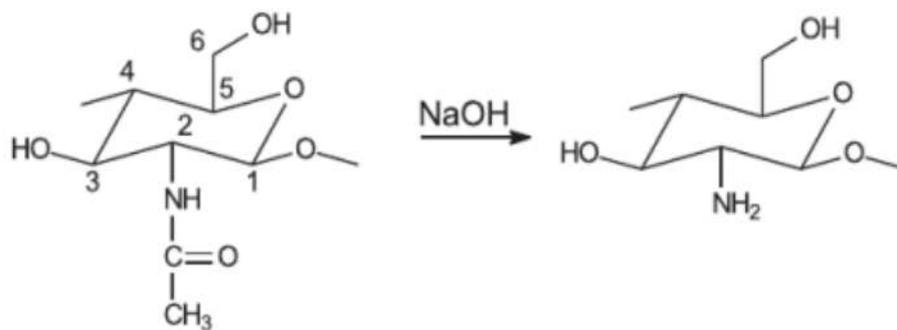
2.8 QUITOSANA

A quitosana é um polissacarídeo composto por N-acetil-2-desoxi-Dglucosamina e 2-amino-2-desoxi-D-glucosamina, catiônico, semicristalino, de cadeia linear, derivado do processo de desacetilação da quitina (KOU; PETERS; MUCALO, 2022).

A quitina, por sua vez, pode ser encontrada em uma variedade de espécies eucarióticas, como crustáceos, insetos e fungos. Seu nome de origem grega *Kliton* significa caixa protetora e de revestimento, é um polissacarídeo de sustentação e apresenta estrutura semicristalina,

sendo uma rede de fibras organizadas. Sua obtenção se dá através de três etapas: desmineralização, desproteínação e despigmentação. Ao ser submetida a tratamento térmico ocorre a desacetilação da quitina transformando-a em quitosana. Portanto, a quitosana é um derivado obtido da reação de desacetilação parcial da quitina (Figura 7) por hidrólise dos grupos acetamida, com soluções muito concentradas de óxido de sódio (40-50%) e temperaturas superiores a 100°C (JIMÉNEZ-GÓMEZ; CECILIA, 2020).

Figura 7. Reação de desacetilação da quitina em quitosana



Fonte: Ferreira, (2016).

A quitina é insolúvel na maioria dos solventes. Enquanto a quitosana é solúvel em soluções ácidas, como o ácido acético. Na desacetilação da quitina, o biopolímero é considerado quitosana quando tem um grau de desacetilação superior a um valor limite 50% (PAUL; KOLESINSKA; SUJKA, 2019). De modo que, a quitosana possui propriedades física e químicas, como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesividade, não toxicidade, afinidade por metais, corantes e proteínas, hidroflicidade, capacidade de criar filmes e outras que a torna aplicável na farmácia, medicina, engenharias, e em diversos tipos de indústrias (KOU; PETERS; MUCALO, 2022).

Sua atividade antimicrobiana e antibacteriana, também fazem da quitosana um biomaterial com diversas aplicações na área de saúde e devido as propriedades como o efeito coagulante, aceleração da cicatrização, ação quimiotática, imunestimulação, mucoadesão e/ou permeabilidade epitelial, tem se tornado cada vez mais atraente para aplicação no âmbito clínico (AYAZ; DEMIR; BOLGEN, 2021).

Essa atividade antimicrobiana da quitosana tem sido correlacionada com a sua capacidade de aumentar a permeabilidade das membranas microbianas exteriores e interiores, resultando em rupturas das membranas celulares bacterianas e consequente saída do conteúdo

intracelular. Este efeito é aparentemente causado por interações eletrostáticas entre as moléculas da quitosana carregada positivamente e a membrana celular carregada negativamente (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2011).

Outro mecanismo associado a atividade antimicrobiana da quitosana está relacionado a interação com o DNA microbiano, pela qual os produtos da hidrólise da quitosana ligados ao DNA celular afetam a síntese de proteínas como resultado da inibição do RNA mensageiro (MATICA *et al.*, 2019).

Todas essas propriedades da quitosana levaram esse biopolímero e seus derivados a aplicações além da medicina, em decorrência de modificações em suas características físico químicas ela pode ser confeccionada no formato de esponjas, fios para suturas cirúrgicas, membranas, géis, fibras, microesferas, comprimidos, drogas de entrega (HU *et al.*, 2021).

Além disso, a quitosana pode ser utilizada para formação de um compósito pela sua aditivação, que pode proporcionar outras propriedades não existentes ou adequação para aplicação desejada. Tais como: Melhorar a resistência mecânica, aumentar o efeito antimicrobiano, e facilitar a cicatrização de feridas e úlceras (SULTANKULOV *et al.*, 2019).

Zhang *et al.* (2021) confeccionaram curativos de quitosana com colágeno com o objetivo de elevar a atividade antibacteriana sobre cepas gram negativas e gram positivas. E para tal utilizaram 3% de quitosana com baixo e alto peso molecular misturada com colágeno tipo I a 1%. Então observaram que o curativo apresentou biocompatibilidade, atoxicidade, retenção de umidade, neovascularização e proliferação de fibroblastos, promovendo a cicatrização de feridas cutâneas. Concluíram que a quitosana somada ao colágeno pode ser um biomaterial promissor para aplicações em curativos (ZHANG *et al.*, 2021).

Já Hassan *et al.* (2021), desenvolveram uma membrana de quitosana, hialurona e fosfatidilcolina dihidroquercetina com o objetivo de aumentar a capacidade antioxidante e reduzir o tempo de cicatrização de feridas. Dessa maneira, utilizaram uma mistura contendo 20 ml de solução de quitosana (3%) preparada em ácido acético a 2%, 1 ml de solução de fosfatidilcolina dihidroquercetina (PCDQ) (10 mM) e 5 ml de solução aquosa de hialuronano (1%) e 1 ml de glicerol, submetidos a evaporação de solvente para confecção de membranas. Assim, obtiveram uma membrana de Ch/HA/PCDQ (Ch-quitosana; HA- hialurona; PCDQ fosfatidilcolina dihidroquercetina), com potência de eliminação de radicais livres, hemocompatibilidade com tendência a aumentar a coagulação do sangue, atividades antibacterianas e anti-inflamatórias, compatibilidade celular com células fibroblásticas de camundongo e epitelização proeminente em comparação com feridas tratadas com gaze de algodão e curativos de Ch/HA (Ch-quitosana; HA- hialurona).

E Biranje *et al.* (2020) formularam um curativo composto de soluções de quitosana 0,5% p/v e carragenina 0,5% p/v, com o objetivo de melhorar a atividade hemostática do curativo e crescimento tecidual. Para isso foram preparados separadamente a solução de quitosana e de carragenina. A quitosana foi preparada pela dissolução em solução aquosa de ácido cítrico 2% p/v e a carragenina em água destilada, sendo as misturas homogeneizadas e submetidas ao processo de liofilização. Deste modo, formularam um curativo composto com maior atividade hemostática, por meio de maior geração de trombina, adesão e agregação de hemácias e plaquetas. Sendo assim, é um potente curativo composto para hemostasia local.

Ainda mais, Santos (2018) preparou um curativo de quitosana incorporado com bioativos naturais, com o propósito de caracterizar e avaliar a influência da incorporação de bioativos naturais na atividade antimicrobiana de membranas de quitosana para uso potencial como curativos de lesões cutâneas. Por essa razão incorporou óleo de cravo e melaleuca, bem como o suco e pó de caju e noni em solução de quitosana, pelo método de evaporação de solvente. E então, obteve que as membranas incorporadas com óleo de cravo e melaleuca apresentaram melhor atividade antimicrobiana.

Também, seguindo o propósito de elaborar curativos, Lemraski *et al.* (2021) formularam curativos com nanofibras de quitosana/álcool polivinílico/cobre, visando impedir o crescimento de filmes bacterianos e controle de liberação de fármaco. Com esse intuito prepararam uma dupla camada composta por poli álcool vinílico e quitosana incorporada com nanopartículas de cobre como uma camada protetora e uma segunda camada com nanofibras de polivinilpirrolidona (PVP). Dessa forma, foi obtido um curativo de dupla camada em nanofibra eficaz no cuidado de feridas abertas, principalmente nas fases iniciais da cicatrização e na prevenção de ocorrência de feridas abertas prolongadas.

Por fim, pode-se observar que os pontos chaves desses estudos com a aplicação da quitosana são o aumento da prevenção de adesão e proliferação bacteriana, bem como, o controle de liberação de fármacos e diminuição do tempo de cicatrização. Através do emprego da quitosana e demais biomateriais para a confecção de membranas, nanofibras e scaffolds, como pode ser observado no quadro resumo (Quadro 4) (CHOI *et al.*, 2019; TOVAR *et al.*, 2020; AMOR *et al.*, 2021).

Quadro 4. Estudos realizados com uso de quitosana, suas aplicações e vantagens

Autor/ Ano	Material	Aplicação	Metodologia	Vantagens
Zhang <i>et al.</i> ,2021	Quitosana-colágeno	Curativo	Scaffolds /liofilizados	✓ Não toxicidade, biocompatibilidade;

				<ul style="list-style-type: none"> ✓ Boa atividade antibacteriana; ✓ Retenção de água.
Hassan <i>et al.</i> , 2021	Quitosana, hialuronano, fosfatidilcolina dihidroquercetina	Curativo polieletrólito multifuncional	Membranas/ evaporação de solvente	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Potência de eliminação de radicais livres, hemocompatibilidade ✓ Atividades antibacterianas e anti-inflamatórias de Ch/HA/PCDQ. Compatibilidade celular com células fibroblásticas de camundongo. ✓ Epitelização proeminente
Biranje <i>et al.</i> , 2020	Quitosana/carragenina	Curativo composto	Liofilização	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Atividade de hemostasia melhorada; ✓ Fixação celular aprimorada, adesão e agregação de hemácias e plaquetas; ✓ Superfície não tóxica;
Santos, 2018	Quitosana/ óleo de cravo, óleo de melaleuca, suco e pó de caju, polpa e pó de noni	Potencial curativo	Membranas/ Evaporação de solvente (casting)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Atividade antimicrobiana; ✓ Aderência e propriedades tênses suficientes e compatíveis para serem aplicadas em curativos;
Lemraski <i>et al.</i> , 2021	Nanofibras de quitosana/ álcool polivinílico/cobre	Curativos de hidrogel de dupla camada	Nanofibras/ Eletrofiação	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Atividade antibacteriana contra diversos tipos de microrganismos; ✓ Redução do tempo de cicatrização de feridas cutâneas; ✓ Controle de liberação do fármaco.
Arafa <i>et al.</i> , 2021	Quitosana/ extrato de repolho roxo	Curativo/hidrogel	Quitosana metacrilada com GMA	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Indicar, visualmente, o pH do leito da ferida com uma propriedade de fácil remoção;
Choi <i>et al.</i> , 2019	Quitosana e S-nitrosoglutationa (GSNO)	Filme de quitosana liberadora de NO	Filme/ evaporação de solvente	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Diminui a viabilidade e biomassa de biofilme; ✓ Melhora a cicatrização de feridas;
Tovar <i>et al.</i> , 2020	Quitosana e óleo essencial de Ruta graveolens	Filme de quitosana de estrutura levemente porosa	Filme formador de emulsões	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Adesão celular e proliferação em baixas concentrações do óleo
Amor <i>et al.</i> , 2021	Quitosana e óleo essencial de manjerição	Filme de quitosana com	Filme/ evaporação de solvente	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Atividade antimicrobiana;

		microcápsulas do óleo essencial		<ul style="list-style-type: none"> ✓ Prolongar a vida útil do produto embalado; ✓ Controlar o crescimento bacteriano;
Soltanzadeh <i>et al.</i> ,2021	Quitosana e óleo essencial de capim-limão	Nanopartículas de quitosana e OE	Nanopartículas/ agitação, centrifugação, lavagem e sonicação	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Atividade antibacteriana e antifúngica

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Comparar o potencial antibacteriano dos óleos essenciais de orégano e tomilho contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* e incorporá-los em membranas de quitosana para o tratamento de lesões por pressão.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de orégano e tomilho contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*;
- Identificar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais de orégano e tomilho contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*;
- Delimitar a Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) dos óleos essenciais de orégano e tomilho contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*;
- Verificar a associação dos óleos essenciais de orégano e tomilho com os antibacterianos frente a cepas *Klebsiella pneumoniae*;
- Desenvolver membranas de quitosana do tipo scaffolds incorporadas com óleos essenciais de orégano e tomilho;
- Caracterizar física, química e estruturalmente as membranas de quitosana incorporadas com óleos essenciais de orégano e tomilho;
- Estudar a degradação das membranas de quitosana incorporadas com óleos essenciais de orégano e tomilho;
- Avaliar a atividade antibacteriana das membranas de quitosana incorporadas com óleos essenciais de orégano e tomilho;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO E LOCALIZAÇÃO DE TESTE EXPERIMENTAIS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas (UACB) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). E no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) – UFCG/UAEMA.

4.2 MICRO-ORGANISMOS

Foram utilizadas as cepas de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883, e clínicas: Kp 101, Kp 103, Kp 104 Kp 105 e Kp 110) mantidas em meio Ágar Muller Hinton (AMH) a uma temperatura de 4 °C. Os inóculos foram obtidos a partir de culturas *overnight* em MH a 37°C e diluídas em solução salina estéril para obter concentração final de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), ajustado pela turvação quando comparado com o tubo 0,5 da escala Mc Farland (BONA *et al.*, 2014).

4.3 SUBSTÂNCIAS

4.3.1 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana foram o meio líquido Muller Hinton e o meio sólido Ágar Muller Hinton, adquiridos na Difco® e preparado de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.2 Substâncias testes

Os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), e tomilho (*Thymus Vulgaris L.*) foram adquiridos na Industria Quinari (Ponta Grossa- PR).

4.4 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

O óleo essencial de orégano e de tomilho foram analisados quanto a sua composição química realizada através de um Cromatógrafo a gás acoplado ao Espectrômetro de Massas quadrupolar (CG-EM), Shimadzu modelo GC-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão), sendo utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30m x 0,25mm d.i. x 0,25 μ m). As condições cromatográficas utilizadas foram: injetor a 220 °C e razão de split 1:10 (3,0 min), gás de arraste He a 0,6 mL/min, temperatura da interface a 250 °C e fonte de ionização por elétrons (35-350 m/z), rampa de temperatura do forno: 40 °C (2 min), com incremento de 3 °C/min até 240 °C por 5 min e volume injetado de 1 μ L (1% de solução em diclorometano).

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos seus padrões de fragmentações com os espectros de massas da base de dados NIST 14 (Mass Spectral Library, 2014) presente no CG-EM; também pela comparação destes com os dados da literatura (Adams, 2007), e através de seus índices de retenção linear (IRL), calculados em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de hidrocarbonetos (C8 a C26) injetada nas mesmas condições da amostra. O índice de retenção linear foi baseado em Van den Dool e Kratz (1963) e Adams (2007). Para a identificação por comparação com espectros disponíveis nestas bases de dados foram consideradas apenas correspondências acima de 90%.

4.5 DETERMINAÇÃO DA CIM (CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA)

A CIM foi determinada utilizando a técnica de microdiluição em placa contendo 96 poços com fundo em “U”. Foi adicionado 100 μ L de caldo Mueller Hinton, duplamente concentrado e 100 μ L dos produtos em estudo (óleo essencial de orégano e óleo essencial de tomilho) em cada poço da placa, nas concentrações de 1024 a 16 μ g/mL. A determinação da CIM foi conduzida com 10 μ L do inóculo previamente preparado e adicionado em cada cavidade. Foi preparado também o controle de crescimento no penúltimo poço, contendo 200 μ L do caldo e a suspensão de micro-organismo e no último poço foi o controle negativo com apenas 200 μ L do caldo, sendo realizado todo o ensaio em duplicata. As placas foram incubadas a 35 \pm 2 °C durante 24 horas, após esse período foi realizada a primeira leitura dos resultados. Em seguida, foi adicionado 20 μ L de solução de resazurina sódica (SIGMA), em água destilada esterilizada na concentração de 0,01 % (p/v), reconhecido como indicador colorimétrico de óxido-redução para bactérias e feito nova incubação a 35 \pm 2 °C. A leitura se procedeu, visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo pela formação de aglomerado de células (botão) e também pela observação da mudança da coloração da solução, de azul para rosa, indicando crescimento do micro-organismo. A CIM foi determinada como a

menor concentração do produto que inibiu o crescimento visível do microrganismo ensaiado, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador (PALOMINO *et al.*, 2002; OSTROSKY *et al.*, 2008; CLSI,2012; BONA *et al.*, 2014).

4.6 DETERMINAÇÃO DA CBM (CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA)

Para a determinação da CBM, após a leitura dos resultados da Concentração Inibitória Mínima, foram feitos inóculos (10 µL) de três diluições a partir da CIM para o meio de caldo Mueller-Hinton (100 µL/cavidade) em placa de microdiluição esterilizada, em seguida seguiu-se para incubação a 35±2 °C por 24 horas, após esse tempo foi adicionado 20 µL de resazurina. Os ensaios foram incubados a temperatura de 35±2 °C por mais 24 horas para confirmação da concentração capaz de inibir o crescimento total das espécies bacterianas, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador (NCUBE *et al.*, 2008; GUERRA *et al.*, 2012).

4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ADERÊNCIA (CIMA)

A Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do composto foi determinado na presença de sacarose a 5%, de acordo com Albuquerque *et al.* (2010) com modificações, usando-se concentrações correspondentes ao composto até a diluição 1:1024. A partir do crescimento bacteriano, a cepa de bactéria foi cultivada a 35±2 °C em caldo Mueller Hinton (DIFCO, Michigan, Estados Unidos), depois foram distribuídos 0,9 mL do subcultivo em tubos de ensaio e, em seguida, adicionado 0,1 mL da solução correspondente às diluições do composto. A incubação foi feita a 35±2 °C por 24 horas com tubos inclinados a 30°. A leitura foi realizada através da observação visual da aderência da bactéria às paredes do tubo, após a agitação do mesmo. O ensaio foi realizado em duplicata. O mesmo procedimento foi realizado para o controle positivo, o digluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard®, Colgate-Palmolive Company, Nova York, EUA). Foi considerada a CIMA a menor concentração do agente em contato com sacarose que impediu a aderência ao tubo de vidro.

4.8 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORÉGANO E TOMILHO COM ANTIBACTERIANOS

Para o estudo de associação do produto com os antibacterianos, foi realizado por meio

da técnica de difusão em disco em meio sólido utilizando discos de papel filtro (BAUER *et al.*, 1966; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Uma alíquota de 20µL da CIM do produto teste (OEs de orégano e tomilho), foi transferida para os discos contendo os antibacterianos (Ampicilina (AMP), Gentamicina (GEN), Ceftriaxona (CEF) e Ciprofloxacino (CIP)), nas suas respectivas concentrações, sendo em seguida alocados em placas de Petri estéreis lisa (140x15) contendo o meio AMH que, previamente foram inoculados com swabs estéreis, um volume aproximadamente de 1mL das suspensões bacterianas. Posteriormente, as placas foram incubadas a 35±2 °C por 24-48h, seguido da realização de sua leitura. Considerar-se-a como efeito sinérgico, quando da ocorrência de halo de inibição do crescimento microbiano formado pela aplicação combinada do composto mais o antibiótico (AB) com diâmetro ≥ que 2mm, quando comparado com o halo de inibição formado pela ação do AB isoladamente. Quando a combinação do produto com o antibacteriano resultar em um halo de inibição com um diâmetro menor do que o obtido pelo o antibacteriano isolado, considerar-se-a efeito antagônico. Foi considerado como efeito indiferente, quando a formação do halo de inibição resultante da combinação, obtive o mesmo diâmetro do antibacteriano quando avaliado individualmente (CLEELAND; SQUIRES, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Todos os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados a serem expostos serão obtidos através da média dos resultados dos dois ensaios paralelos.

4.9 PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS

A confecção das membranas de quitosana e quitosana com óleo essencial de orégano e tomilho, do tipo scaffolds, foi realizada seguindo o processo de liofilização que foi obtido a partir de adaptações provenientes de Cruz *et al.*, (2016). É possível observar na Figura 8 o fluxograma de confecção das membranas.

4.9.1. Preparação das membranas de quitosana sem incorporação de óleo essencial (Q)

A solução de quitosana de médio peso 2% (m/v) foi preparada através da dissolução do polímero em ácido acético glacial a 2% (v/v), sob agitação mecânica a 50°C, por 2 h a 346 rpm. Ao término foi verificado o pH, 4,16, com Ph- fix 0-14 Macherey Nagel. Posteriormente foi vertida (10 mL) em placas Petri em acrílico com 60 mm x15 mm e acondicionadas no ultra freezer (-84°C) por 24 horas para congelamento. Em seguida foram transferidas para o

liofilizador L 108, da LIOTOP, permanecendo por um período de 72 h, com o objetivo de formação de membranas com poros interconectados.

4.9.2. Preparação das membranas de quitosana com incorporação de óleo essencial de orégano (QO)

A solução de quitosana de médio peso 2% (m/v) foi preparada através da dissolução do polímero em ácido acético glacial a 2% (v/v), sob agitação mecânica a 50°C, por 2 h a 346 rpm. Para a solução de quitosana com óleo essencial de orégano, foi adicionado 40 µl de OE de orégano à solução a fim de se obter uma concentração final de 4% (m/v). Assim, com a solução preparada, posteriormente, foi vertida (10 mL) em placas de Petri em acrílico com 60 mm x15 mm e acondicionadas no ultra freezer (-84°C) por 24 horas para congelamento. Em seguida foram transferidas para o liofilizador L 108, da LIOTOP, permanecendo por um período de 72 h, com o objetivo de formação de membranas com poros interconectados. Posteriormente, seguiu-se a neutralização das membranas.

4.9.3. Preparação das membranas de quitosana com incorporação de óleo essencial de tomilho (QT)

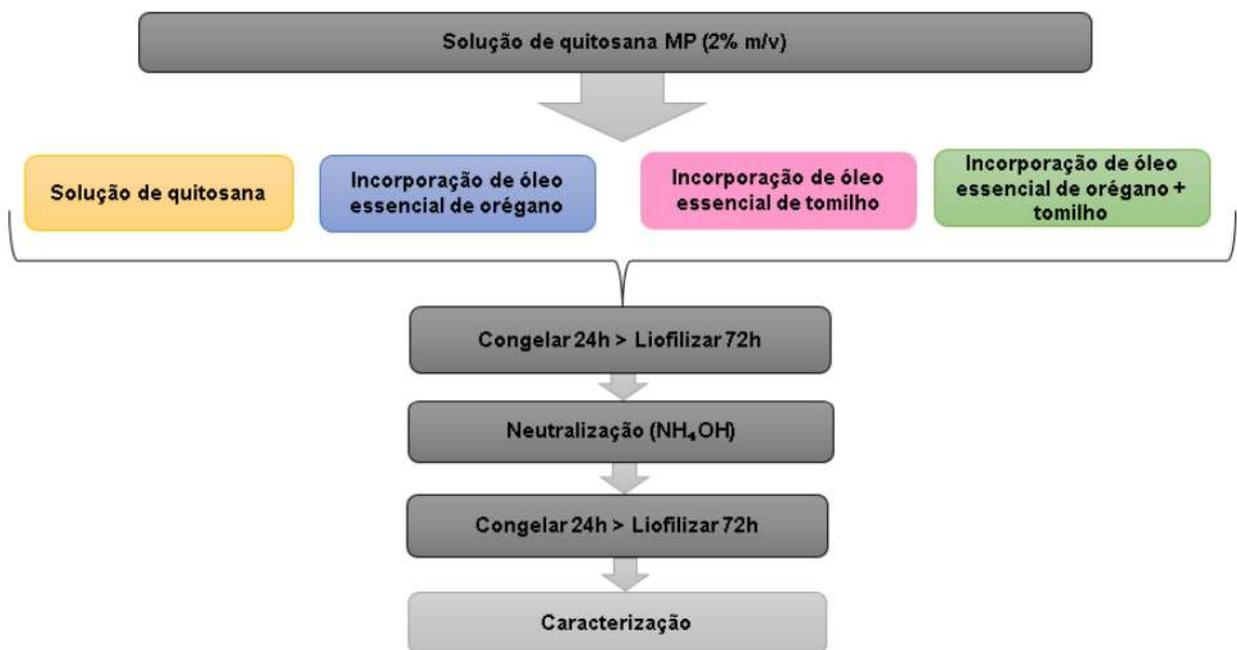
A solução de quitosana de médio peso 2% (m/v) foi preparada através da dissolução do polímero em ácido acético glacial a 2% (v/v), sob agitação mecânica a 50°C, por 2 h a 346 rpm. Para a solução de quitosana com óleo essencial de tomilho, foi adicionado 40 µl de OE de tomilho à solução a fim de se obter uma concentração final de 4% (m/v). Assim, com a solução preparada, posteriormente, foi vertida (10 mL) em placas de Petri em acrílico com 60 mm x15 mm e acondicionadas no ultra freezer (-84°C) por 24 horas para congelamento. Em seguida foram transferidas para o liofilizador L 108, da LIOTOP, permanecendo por um período de 72 h, com o objetivo de formação de membranas com poros interconectados. Posteriormente, seguiu-se a neutralização das membranas.

4.9.4. Preparação das membranas de quitosana com incorporação de óleo essencial de orégano e tomilho (QOEOT)

A solução de quitosana de médio peso 2% (m/v) foi preparada através da dissolução do polímero em ácido acético glacial a 2% (v/v), sob agitação mecânica a 50°C, por 2 h a 346 rpm.

Para a solução de quitosana com óleo essencial de orégano e tomilho, foi adicionado 40 μl de OE de orégano e 40 μl de OE tomilho à solução a fim de se obter uma concentração final de 8% (m/v) de cada óleo. Assim, com a solução preparada, posteriormente, foi vertida (10 mL) em placas de Petri em acrílico com 60 mm x15 mm e acondicionadas no ultra freezer (-84°C) por 24 horas para congelamento. Em seguida foram transferidas para o liofilizador L 108, da LIOTOP, permanecendo por um período de 72 h, com o objetivo de formação de membranas com poros interconectados. Posteriormente, seguiu-se a neutralização das membranas.

Figura 8. Fluxograma da confecção de membranas



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

4.10. PROCESSO DE NEUTRALIZAÇÃO

As amostras foram neutralizadas com hidróxido de amônio (NH₄OH) por ser uma base solúvel, fraca e volátil, contribuindo para a ausência de resíduos do sal, ao se utilizar hidróxido de sódio (NaOH), conforme constatado na pesquisa de Cruz (2016). A solução de hidróxido de amônio a 5% (v/v) foi preparada na capela de exaustão de gases da marca SPLabor, permanecendo as amostras sob atmosfera dessa solução, isolada sob uma cúpula de vidro, por um período de 72 horas. Passado o período determinado, as mesmas foram retiradas e seguiu-se uma breve lavagem das membranas com água destilada e, após serem intumescidas, foram congeladas e liofilizadas.

4.11. CARACTERIZAÇÕES

4.11.1. Microscopia Ótica (MO)

A técnica de microscopia ótica foi utilizada para analisar a morfologia de superfície das membranas de quitosana incorporadas com óleo essencial e sem óleo essencial, onde as amostras foram submetidas à análise pelo método de iluminação por reflexão de luz visível. O canhão acoplado a estação de captura de imagem foi o da série Mx, no caso o Mx (G) – 2016Z. Foram utilizados dois tipos de lentes adaptadoras para essa análise, a lente AD – 2016S que permite, no modo de observação normal, com ampliações de 20-160X e a lente AD- 2016LOW, que na observação em modo de baixa ampliação, possibilita ampliações de 6-48X. O Software usado para a obtenção das imagens foi o 2D measure e o equipamento foi o Microscópio Hirox modelo KH-1300, com ampliação de 100 x (GADELHA, 2021).

4.11.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de membranas de quitosana com óleo essencial e sem óleo essencial foram submetidas a técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), em temperatura ambiente, o equipamento utilizado foi o Spectrum 400 da Perkin Elmer. A técnica FTIR foi utilizada para testar a identidade dos compostos, dando informações estruturais sobre as bandas dos agrupamentos das moléculas e os grupos funcionais que participam das amostras, utilizando a faixa de varredura de 4000 a 650 cm^{-1} (AGUIAR *et al.*, 2012).

4.11.3. Termogravimetria (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) das amostras foi realizada em equipamento da marca Perkin Elmer modelo Pyris 1 TGA, com uma quantidade de material de aproximadamente 5,0 mg, as amostras foram pesadas em balança de precisão ($\pm 0,1\text{mg}$). O material foi aquecido a uma razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min^{-1} , utilizando cadinho de alumínio. As curvas de TGA foram registradas de 20°C a 200°C , com a finalidade de estudar a estabilidade e decomposição térmica dos componentes da membrana e assim, verificar uma possível perda de massa em função da temperatura para observar as condições de processamento da amostra (GALDINO, 2022).

4.11.4. Grau de intumescimento

Este ensaio foi realizado no intuito de investigar o comportamento do material durante a imersão e permanência em solução aquosa semelhante ao meio interno do organismo. A absorção de líquido pelo material pode ser um fator importante na liberação dos componentes do óleo essencial, nesse sentido reside sua importância.

Para realização deste ensaio foram preparadas amostras em quintuplicata das membranas de cada composição com dimensão de 1,0 x 1,0 cm. Cada amostra foi colocada em estufa a 40°C, por 24 horas, em seguida pesada em balança analítica de precisão digital antes da imersão em 5 mL de solução tampão fosfato (PBS) (pH 7,4) e colocada em uma estufa bacteriológica a 37°C. As amostras foram pesadas nos tempos de 24 horas. No ato da pesagem, elas foram removidas da solução, secas ligeiramente em papel absorvente para eliminar o excesso da solução, e o peso úmido de cada fragmento foi medido na mesma balança. O grau de intumescimento (em porcentagem) foi determinado pela Equação 1 (LUCENA, 2020).

$$\text{Equação 1: } GI = \left(\frac{M_i - M_s}{M_s} \right) \times 100 (\%)$$

Onde:

M_i - Massa intumescida

M_s - Massa seca

4.11.5. Biodegradação Enzimática

Esta caracterização foi baseada nas normas ASTM F1635-04 *Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants* (2009) e a ASTM F2103-01 *Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Products Applications* (2007).

O Ensaio de Biodegradação Enzimática tem o objetivo de verificar a degradação de um biomaterial em meios biológicos, pois é uma das variáveis de grande relevância para sua caracterização, já que tal propriedade está diretamente relacionada ao tempo de vida útil dos materiais após o início de sua utilização pelo paciente (DALLAN,

2005). Para realização desse estudo, as amostras foram divididas em dois grupos: no primeiro, as amostras das membranas foram imersas em solução de lisozima/*Phosphate Buffered Saline* – PBS, com concentração de 1,5 mg/mL, e no segundo grupo foi utilizada apenas a solução de PBS para controle (FOOK, 2012).

Anteriormente à imersão, cada amostra foi colocada em estufa a 40°C, por 24 horas, em seguida pesada em balança analítica de precisão digital. Foram utilizadas cinco amostras de cada membrana produzida, tanto para o tampão PBS, como para a solução de lisozima/PBS. As membranas foram imersas em cada uma das soluções descritas e avaliadas nos períodos de 1 dia, até 7 dias e 14 dias, então foram colocadas na estufa bacteriológica a 37°C. Ao final de um dia, foi removido o 1º lote, e as amostras foram lavadas em água destilada, colocadas no ultra freezer, a uma temperatura de -84°C por 24 horas, e em seguida no liofilizador pelo mesmo tempo sendo, posteriormente, colocadas em uma estufa a 40°C durante quatro horas e pesadas em balança analítica.

Nos segundo e terceiro lotes, as soluções de PBS e PBS/lisozima foram trocadas por novas soluções com a mesma composição e concentração diariamente e, novamente, acondicionados na estufa à mesma temperatura. Após 7 dias, o segundo lote foi removido da estufa, passando pela mesma sequência de procedimentos já descritos, assim como o lote subsequente.

As diferenças percentuais das massas das amostras antes e após o ensaio forneceram os resultados referentes à degradação das membranas, observados a partir da média de ensaios em quintuplicata. O cálculo da perda de massa foi determinado pela Equação 2, expressa abaixo:

$$\text{Equação 2: } BE = \left(\frac{M_o - M_f}{M_f} \right) \times 100\%$$

Onde: Mo - Massa inicial

Mf - Massa final

4.11.6 Atividade antibacteriana das membranas de quitosana e membranas de quitosana incorporadas com óleo essencial de orégano e óleo essencial de tomilho

O teste microbiológico foi realizado com o intuito de determinar se a membrana de quitosana com óleo essencial (tomilho e/ou orégano) incorporada é capaz de inibir o crescimento da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, pela metodologia de difusão em ágar por disco e poço.

Portanto, foi avaliada a atividade antibacteriana das membranas de quitosana, quitosana com óleo essencial de orégano, quitosana com óleo essencial de tomilho, e quitosana com óleo essencial de orégano e tomilho, contra a bactéria *Klebsiella pneumoniae*. A técnica para o teste foi desenvolvida segundo Bona *et al.* (2014), com modificações. Para tal, como meio de cultura em placas Petri foi utilizado o ágar Mueller Hinton, e foram formados orifícios de 6mm de diâmetro com auxílio de um molde originando os poços. As placas foram inoculadas na superfície pelo micro-organismo com o uso de um swab, então foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas.

Membranas, em forma de discos, foram depositadas assepticamente nos poços dos meios inoculados, os quais foram incubados a 37 °C por 24 h. Após a incubação, as placas foram observadas quanto à homogeneidade do crescimento bacteriano e, nos casos em que for verificada inibição do crescimento, o diâmetro do halo foi medido com auxílio de uma régua milimétrica. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados corresponderão aos valores médios.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O surgimento da resistência antimicrobiana incentivou pesquisadores a explorar alternativas terapêuticas, uma das quais inclui o uso de produtos naturais, como óleos essenciais (OE), para fonte de novos fármacos (ALJAAFARI *et al.*, 2021). Na presente pesquisa os óleos essenciais de orégano e tomilho foram analisados quanto aos seus constituintes químicos por meio do tempo de retenção apresentado em cada pico do espectro, com relação a sua atividade antimicrobiana de forma isolada e associados com antimicrobianos já comercializados. Além disso, os OEs foram incorporados em membranas porosas de quitosana (scaffolds), que foram caracterizadas quanto a sua estrutura química, física e biológica,

5.1 COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS AVALIADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

Os óleos essenciais de orégano e tomilho foram avaliados quanto aos seus constituintes químicos por meio da Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), de forma que se considerou o tempo de retenção apresentado em cada pico do espectro para cada óleo, como pode ser observado abaixo nas Tabelas 1 e 2, e nas Figuras 9 e 10.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de orégano

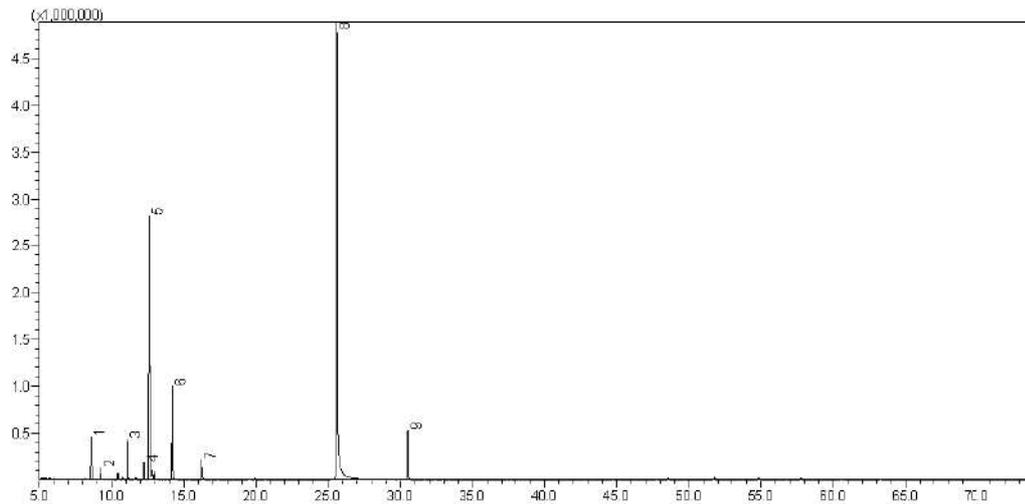
Picos	Tr	Composto	IRL _{Lit}	IRL _{Exp}	Área (%)
1	8.586	Alfa-Pineno	928	939	3.73
2	9.234	Canfeno	944	953	1.07
3	11.090	Mirceno	988	987	3.57
4	12.244	Careno	995	997	1.55
5	12.607	Cimeno	1024	1026	23.39
6	14.199	Gama-terpineno	1054	1058	8.23
7	16.243	Linalol	1095	1098	1.79
8	25.623	Carvacrol	1302	1298	40.52
9	30.505	Cariofileno	1413	1404	4.37

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

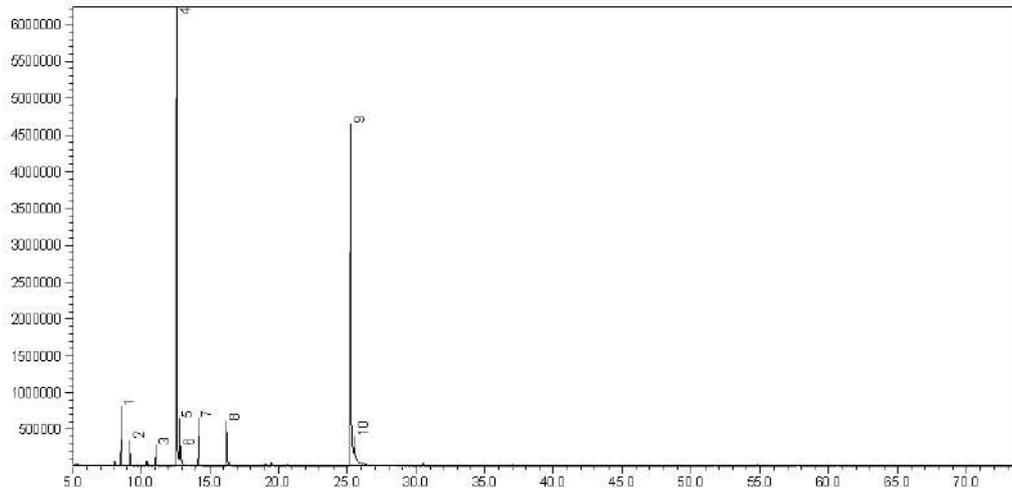
Tabela 2. Composição química do óleo essencial de tomilho

Picos	Tr	Composto	IRL _{Lit}	IRL _{Exp}	Área (%)
1	8.580	Alfa-pineno	928	939	5.00
2	9.227	Canfeno	944	953	2.22
3	11.082	Mirceno	988	986	1.73
4	12.622	Para-Cimeno	1021	1028	39.00
5	12.815	Limoneno	1024	1031	4.09
6	12.925	Eucaliptol	1029	1033	1.63
7	14.193	Gama-Terpineno	1054	1059	4.07
8	16.236	Linalol	1095	1096	3.83
9	25.278	Timol	1293	1290	29.10
10	25.546	Carvacrol	1302	1296	1.67

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Figura 9. Cromatograma do óleo essencial de orégano

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Figura 10. Cromatograma do óleo essencial de tomilho

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Como resultado identificou-se um total de 9 constituintes presentes no óleo essencial de orégano: o alfa pineno, canfeno, mirceno, careno, cimeno, gama-terpineno, linalol, carvacrol e cariofileno. E a partir da análise das porcentagens verificamos que o carvacrol se apresenta como composto majoritário, com alta porcentagem (40,52%). Já para o óleo de tomilho, identificou-se um total de 10 constituintes: o alfa pineno, canfeno, mirceno, para-Cimeno, limoneno, eucaliptol, gama-terpineno, linalol, timol e carvacrol. E como compostos majoritários tivemos o para-cimeno e o timol, com porcentagem de 39% e 29,1%, respectivamente.

Corroborando com o descrito por *Penteado et al. (2021)*, que em suas análises, encontrou o carvacrol também como um dos componentes majoritários do óleo essencial de orégano, com uma porcentagem de 69,1%, sendo esse óleo também avaliado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Da mesma forma, *Gomes et al. (2019)*, utilizando-se da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas ao analisar a composição química do OEO obteve uma porcentagem de 45,74% de carvacrol, e, ainda, observou que este é o composto majoritário do óleo. Essas variações de porcentagens são explicadas a partir das condições ambientais como altitude e disponibilidade de água, estação do ano, estágio fenológico da planta, do tipo de extração, entre outros fatores (*LOMBREA, A. et al., 2020*).

O carvacrol enquanto componente do OEO se apresenta como principal composto responsável pela atividade antibacteriana (*OLIVEIRA et al., 2008*). *Ultee et al. (2002)* descreve

que o carvacrol juntamente com o timol, são capazes de desintegrar a membrana externa de bactérias gram negativas. E, de forma mais específica, o carvacrol é responsável pelo esgotamento da reserva intracelular de ATP (trifosfato de adenosina) e pelo aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática para a entrada de cátions, alterando os processos celulares essenciais, resultando em morte bacteriana (MAGI; MARINI; FACINELLI, 2015).

Enquanto, ao avaliar o óleo de tomilho, por meio de um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa e detector de ionização de chama (GCMS-FID), Ahmad; Van Vuuren; Viljoen (2014), observaram que OET apresentou 22 compostos, sendo o timol (60,18%) e o para-cimeno (15,44%) os compostos majoritários. Da mesma maneira, Antih *et al.* (2021), utilizando um sistema de cromatografia gasosa de duas colunas/detectores duplos Agilent GC-7890B (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), avaliou três amostras de óleo essencial de tomilho e obteve que o timol (29,52%, 41,31% e 48,65%) e o para-cimeno (16,43%, 25,35% e 12,90%) foram os dois principais constituintes do OET.

Confirmando o encontrado na presente pesquisa e os estudos relatados acima, para o óleo de tomilho, Galovicova *et al.* (2021), por meio da cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC/MS) e cromatografia gasosa (GC-FID), avaliaram o óleo essencial de tomilho e detectaram que os dois principais componentes do óleo essencial de *T. vulgaris* é o timol (48,1%), e o para-cimeno (11,7%).

O óleo de tomilho é um dos 10 tipos de óleos essenciais mais comercializados em todo o mundo, e apresenta atividade antioxidante, efeitos antibacterianos e antifúngicos (DEL RÉ; JORGE, 2012). Acredita-se que a extremidade hidrofóbica destes componentes interage com a membrana celular das bactérias, alterando sua permeabilidade para cátions como hidrogênio (H⁺) e potássio (K⁺). E esse descontrole no gradiente de íons leva as células bacterianas à morte (SATYAL *et al.*, 2016).

5.2 DETERMINAÇÃO DA CIM, CBM E CIMA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORÉGANO E TOMILHO CONTRA CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

A CIM foi determinada em meio líquido e nas diferentes concentrações sugeridas na metodologia, para o óleo essencial de orégano e o de tomilho. Dessa maneira, a menor concentração capaz de inibir de forma visível o crescimento bacteriano foi considerada a CIM.

Conforme apresentado na tabela 3, observou-se que os resultados da CIM para o óleo essencial de orégano foi de 128 µg/mL para três, das seis cepas testadas de *Klebsiella*

pneumoniae. Dessa forma, sendo considerada uma CIM50 (menor concentração capaz de inibir o crescimento em 50%) de 128µg/mL.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de orégano contra diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

Cepa bacteriana/ Substância	<i>Atcc</i> <i>13883</i>	<i>Kp101</i>	<i>Kp103</i>	<i>Kp104</i>	<i>Kp105</i>	<i>Kp110</i>
1024 µg/mL	-	-	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	-	-	-	-
256 µg/mL	-	-	-	-	-	-
128µg/mL	-	+	-	+	+	-
64 µg/mL	+	+	+	+	+	+
32µg/mL	+	+	+	+	+	+
16µg/mL	+	+	+	+	+	+
8µg/mL	+	+	+	+	+	+
4µg/mL	+	+	+	+	+	+
Controle de esterilidade	-	-	-	-	-	-
Controle de crescimento	+	+	+	+	+	+

(+) com crescimento (-) sem crescimento

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Já, na tabela 4, observou-se que os resultados da CIM para o óleo essencial de tomilho foi de 256 µg/mL para quatro, das seis cepas testadas de *Klebsiella pneumoniae*, e 128 µg/mL para as outras duas (*Kp104* e *Kp 105*). Dessa forma, sendo considerada uma CIM50 (menor concentração capaz de inibir o crescimento em 50%) de 256µg/mL.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de tomilho contra diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

Cepa bacteriana/ Substância	<i>Atcc</i> <i>13883</i>	<i>Kp101</i>	<i>Kp103</i>	<i>Kp104</i>	<i>Kp105</i>	<i>Kp110</i>
1024 µg/mL	-	-	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	-	-	-	-
256 µg/mL	-	-	-	-	-	-
128µg/mL	+	+	+	-	-	+
64 µg/mL	+	+	+	+	+	+
32µg/mL	+	+	+	+	+	+
16µg/mL	+	+	+	+	+	+
8µg/mL	+	+	+	+	+	+
4µg/mL	+	+	+	+	+	+
Controle de esterilidade	-	-	-	-	-	-
Controle de crescimento	+	+	+	+	+	+

(+) com crescimento (-) sem crescimento

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Então, tendo em conta a categorização de Sartoratto *et al.* (2004), através da qual pode-se classificar a substância como forte quando possui CIM de até 500µg/mL, moderada para CIM de 600 µg/mL a 1500µg/mL e fraca para CIM acima de 1500µg/mL. Obteve-se que os óleos essenciais de orégano e de tomilho apresentaram atividade antimicrobiana forte sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

Outra avaliação realizada sobre a atividade antimicrobiana dos OEs refere-se a característica bactericida ou bacteriostática e para isso, é analisada a razão da Concentração Bactericida Mínima (CBM) pela CIM. Então, a CBM para as cepas de *Klebsiella pneumoniae* foi determinada a partir da menor concentração dos óleos essenciais de orégano e de tomilho que resultou em inibição visível do crescimento do microrganismo.

De acordo com a tabela 5, observam-se os dados obtidos para a CBM do óleo essencial de orégano e é possível perceber que os valores foram os mesmos para algumas cepas e superiores para outras em relação a CIM.

Tabela 5. Concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de orégano contra diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

Cepa bacteriana/ Substância	<i>Atcc</i> 13883	<i>Kp101</i>	<i>Kp103</i>	<i>Kp104</i>	<i>Kp105</i>	<i>Kp110</i>
1024 µg/mL	-	-	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	-	-	-	-
256 µg/mL	-	+	-	-	-	-
128 µg/mL	+	+	+	+	+	+
Controle de esterilidade	-	-	-	-	-	-
Controle de crescimento	+	+	+	+	+	+

(+) com crescimento (-) sem crescimento

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Já, de acordo com a tabela 6, observam-se os dados obtidos para a CBM do OE de tomilho, e é possível perceber que assim como para o OE de orégano, os valores foram os mesmos para algumas cepas e superiores para outras em relação a CIM.

Tabela 6. Concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de tomilho contra diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

Cepa bacteriana/ Substância	<i>Atcc</i> 13883	<i>Kp101</i>	<i>Kp103</i>	<i>Kp104</i>	<i>Kp105</i>	<i>Kp110</i>
1024 µg/mL	-	-	-	-	-	-
512 µg/mL	-	+	-	-	-	-
256 µg/mL	-	+	+	-	-	-
128 µg/mL	+	+	+	+	+	+
Controle de esterilidade	-	-	-	-	-	-
Controle de crescimento	+	+	+	+	+	+

(+) com crescimento (-) sem crescimento

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Por fim, para determinação da atividade bacteriostática ou bactericida, a razão da CBM e CIM é então analisada. Pois, de acordo com Hafidh *et al.* (2011), o composto é considerado bactericida quando essa razão está entre 1: 1 a 2: 1, e o composto é considerado como bacteriostático quando a relação for maior que 2:1.

Sendo assim, de acordo com a tabela 5, o OE de orégano tem atividade bactericida, com CIM variando entre 128 µg/mL e 256 µg/mL, e CBM de 512 µg/mL para cepa Kp 101 e 256 µg/mL para as outras cinco cepas (ATCC 13883, Kp 103, Kp 104, Kp105 e Kp110). E, como apresentado na tabela 6, o óleo essencial de tomilho apresentou atividade bactericida com CBM de 1024 µg/mL para a cepa Kp 101, de 512 µg/mL para a cepa Kp 103, e 256 µg/mL para quatro cepas (ATCC 13883, Kp 104, Kp105 e Kp110), e CIM de 256µg/mL sobre cepas de *K. pneumoniae*.

Nesse contexto, verifica-se que na literatura existem estudos voltados a análise da atividade antimicrobiana de OEs, como por exemplo, o de Kozics *et. al.* (2019), no qual obtiveram que o óleo essencial de orégano apresentou uma CIM de 0,05% m/v e CBM de 0,05% m/v sobre as cepas bacterianas da *K. pneumoniae* KMB522, através do método de diluição em micropoços. Dessa forma, os autores consideraram o óleo essencial de orégano bactericida, portanto eficaz contra a *K. pneumoniae*.

Já, Kosakowska *et. al.* (2021), avaliaram o óleo essencial de *orégano vulgare* (grego) sobre várias cepas bacterianas gram positivas e gram negativas, pelo método de microdiluição. E, obtiveram uma CIM variando entre 2-8 mg × mL⁻¹ e CBM entre 4-16 mg × mL⁻¹ apresentando as duas cepas de *E. coli* ATCC 25922 e *micro diluição. coli* O157:H7 ATCC 700728, ambas gram negativas, como as cepas mais susceptíveis dentre as cepas testadas. Isto

posto, concluíram que o *orégano vulgare* (grego) apresentou atividade bacteriostática e bactericida.

Do ponto de vista dos compostos responsáveis pelas principais atividades terapêuticas identificadas no óleo essencial de orégano, se observa como mais representativos o carvacrol e o timol (BORA *et al.* 2022). Dessa forma, verifica-se no estudo de Guarda *et al.* (2011), que a capacidade antimicrobiana do carvacrol e do timol micro encapsulados foi de 0,225mg/mL e 0,250 mg/mL respectivamente, contra os microrganismos da *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*.

Em outro estudo, Jan *et al.*, (2020), analisando a atividade do óleo essencial de orégano, tendo o carvacrol como principal constituinte, sobre bactérias, fungos e leveduras, e pelo método de microdiluição em poços, obtiveram que as bactérias foram as mais afetadas, e frente a essas cepas bacterianas foi identificada uma CIM entre 31,25–128 µl/ml.

E, também, no estudo de Fratini *et al.* (2017), ao analisar a concentração inibitória mínima do óleo essencial de orégano, identificou-se que seu principal constituinte era o carvacrol (65,93%), e obteve-se do ensaio de microdiluição uma CIM \leq 0,240 mg/mL para oito cepas de *S. aureus* e CIM \leq 0,480 mg/mL para outras cinco cepas também de *S. aureus*.

Ainda mais, com relação ao óleo essencial de tomilho verificamos estudos como o de Man *et al.* (2019), no qual avaliaram a atividade de seis óleos essenciais: Olíbano (resina de *Boswellia sacra*), murta (*Myrtus communis*), tomilho (*Thymus vulgaris*), limão (*Citrus limon*), orégano (*Origanum vulgare*) e lavanda (*Lavandula angustifolia*), e a susceptibilidade de seis cepas bacterianas, incluindo Gram-positivas e Gram-negativas, envolvidas em infecções hospitalares, dentre elas a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Para isso utilizaram dois métodos: agregados micelares compostos de OEs e água, e extrato aquoso de OE. Assim, verificaram melhor atividade pelo método de agregados micelares, com CIM e CBM variando entre 0,1% e 50% v/v, e especificamente para o óleo de tomilho sobre a cepa de *K. Pneumoniae* ATCC 13883 CIM e CBM de 3.1%. Enquanto os extratos aquosos mostraram menor atividade bacteriostática e bactericida com CIM e CBM variando de 6,3% a >50% v/v, e CIM e CBM de 12,5% para o óleo de tomilho sobre a *K. Pneumoniae* ATCC 13883. Nesse caso, o óleo de tomilho foi bactericida tanto como agregado micelar, quanto como em extrato aquoso.

Ao passo que, Radaelli *et al.* (2016) determinaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de condimentos utilizados comumente no Brasil, *Ocimum basilicum* L. (manjericão), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Origanum majorana* L. (manjerona), *Mentha piperita* L. var. *Piperita* (hortelã), *Thymus vulgaris* L. (tomilho) e *Pimpinella anisum* L. (anis) contra cepas do tipo A de *C. perfringens* ATCC 13124, pelo método de microdiluição. E

obtiveram, dentre todos os óleos avaliados, que o óleo essencial das folhas de *T. vulgaris* apresentou os menores valores de CIM e CBM (1,25 mg mL⁻¹), dessa forma o óleo de tomilho demonstrou forte atividade bactericida.

E Xiao *et al.* (2020), avaliaram a atividade antibacteriana de dez tipos de OEs sobre cepas de *S. aureus*, pelo método de microdiluição, e observaram que o OE de tomilho inibiu o crescimento de *S. aureus* com uma CIM de 0,125%.

Levando em conta a atividade antiaderente, foi possível observar que tanto o óleo essencial de orégano, quanto o óleo essencial de tomilho, como o digluconato de clorexidina 0,12% não conseguiram inibir a formação de biofilme nas proporções testadas, conforme demonstra a tabela 7.

Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima de Aderência em µg/mL do óleo essencial de orégano, tomilho e do digluconato de clorexidina 0,12% contra a cepa de *Klebsiella pneumoniae* (Kp105).

Óleo Essencial de Orégano								
µg/mL	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
	+	+	+	+	+	+	+	+
Óleo Essencial de Tomilho								
µg/mL	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
	+	+	+	+	+	+	+	+
Digluconato de clorexidina 0,12%								
µg/mL	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
	+	+	+	+	+	+	+	+

(-) Sem adesão a parede do tubo (+) Com adesão a parede do tubo.

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Contudo, Alibi *et al.* (2020), avaliaram as atividades: antimicrobiana, antibiofilme, e antioxidante de quatro tipos de OEs, o *Cinnamomum verum* (canela), *Origanum majorana* (manjerona), *Thymus vulgaris* (tomilho), e *Eugenia caryophyllata* (cravo) sobre 105 cepas clínicas multirresistentes, do tipo Gram-positivas e Gram-negativas, dentre elas a *Klebsiella pneumoniae*, pela determinação do número de UFC. E concluíram que os OEs de canela, tomilho e cravo reduziram a formação de biofilme para todas as espécies testadas.

E Lee *et al.* (2017) analisaram a atividade antibiofilme do óleo essencial de orégano e de tomilho vermelho sobre cepas de *Escherichia coli* uropatogênica, por meio de microscopia de varredura confocal a laser. Então, obtiveram que os dois óleos inibiram a formação de

biofilme em mais de 60% das cepas avaliadas e associaram esse efeito a inibição da produção de fimbrias e motilidade natatória.

Em contrapartida, Cabarkapa *et al.* (2019) objetivando determinar os compostos bioativos dos OEs de *Origanum heracleoticum*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e *Thymus serpyllum*, e avaliar sua atividade antimicrobiana e antibiofilme contra *Salmonella Enteritidis* realizou o ensaio de formação de biomassa de biofilme e encubou com os OEs e com os compostos bioativos dos OEs. Para tanto, obteve para os biofilmes de *Salmonella Enteritidis*, o OE de *O. heracleoticum* apresentou o maior efeito, seguido por *O. vulgare*, *T. vulgaris*, carvacrol e timol, enquanto o OE de *T. serpyllum* mostrou o efeito mais fraco em relação à prevenção de crescimento de biofilme e erradicação de biofilmes pré-formados.

Perez *et al.* (2019) também avaliaram a atividade antiaderente/antibiofilme de nanovesículas contendo óleo essencial de tomilho e da vancomicina (antibiótico comercializado), sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 e quatro isolados clínicos de *S. aureus* resistentes à meticilina, por meio da observação da densidade ótica da concentração de UFC. Então obtiveram CIM variando entre 2 mg/ml e >4 mg/ml para as nanovesículas de OET e CIM de 4-8 µg/ml para a vancomicina. Enquanto a CBM foi > 4 mg/ml para nanovesículas de OET e CBM entre 16-32 µg/ml para vancomicina. Por fim, concluíram que as nanovesículas de OE de tomilho apresentam atividade antibiofilme e a vancomicina não inibiu a formação de biofilme.

Bem como, analisando o extrato de *Thymus vulgaris* L, Oliveira, *et al.* (2017) avaliaram a atividade antibiofilme mono e polimicrobiana. Para tanto, foram analisadas as cepas de *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* e *P. aeruginosa*, bem como biofilmes polimicrobianos compostos por *C. albicans* associados a *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* ou *P. aeruginosa*. Dessa maneira, o biofilme foi cultivado por 48 h em agitação e posteriormente foi exposto por 5 min ao extrato de *T. vulgaris* L. (200 mg/mL). Por fim, observaram que o extrato de *T. vulgaris* L. atuou efetivamente no controle de biofilmes monomicrobianos de *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* e *P. aeruginosa* e biofilmes polimicrobianos composto por *C. albicans* com *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* ou *P. aeruginosa*, apresentando reduções significativas em unidades formadoras de colônia (UFC)/ mL.

Além disso, levando em conta a cepa bacteriana, Ramalho *et al.* (2020) utilizaram cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Kp 102), cultivada em caldo Mueller Hinton em tubos de ensaio com o intuito de avaliar a Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora*, e como controle positivo foi empregado o digluconato de clorexidina a 0,12%. Dessa maneira, ao analisar os resultados da

atividade antiaderente dos OEs obteve-se que OE de *Eucalyptus globulus* exibiu uma boa eficiência contra a formação do biofilme por *Klebsiella pneumoniae* demonstrando resultado equivalente ao controle digluconato de clorexidina 0,12%, e inibindo a formação do biofilme na mesma concentração 1:8. Entretanto, a análise do OE de *Eucalyptus citriodora* apresentou formação do biofilme às paredes do tubo, portanto não apresentou inibição contra a *Klebsiella pneumoniae* em nenhuma concentração.

E Souza *et al.* (2021), também utilizando cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Kp 102) cultivada em caldo Mueller Hinton em tubos de ensaio, avaliaram a atividade antiaderente do óleo essencial de *Lavandula híbrida Grosso*, tendo como controle positivo o digluconato de clorexidina a 0,12%. Dessa maneira, foi possível observar que o OE demonstrou uma melhor propriedade do que o digluconato de clorexidina 0,12%, pois apresentou uma menor concentração capaz de inibir a aderência de biofilme ao tubo, sendo 1:32 para o óleo essencial de *Lavandula híbrida Grosso* e 1:8 para o digluconato de clorexidina 0,12%. Então, concluíram que o OE pode ser utilizado como método alternativo para o controle de biofilme na presença da *K. pneumoniae*.

Por fim, Rajasekharan *et al.* (2017) investigaram o potencial antiaderente do extrato de *Arctium lappa Linn* (raiz de bardana) e de um de seus componentes, o ácido clorogênico, sobre isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*. O extrato de raiz de bardana (BRE) (20-200 µg/ml) ou o ácido clorogênico (CGA) (0,028- 0,28 mmol/l) foram adicionados ao meio NB suplementado com 0,5% de glicose e inoculado com 1% de inóculo bacteriano, e o crescimento do biofilme foi quantificado pelo ensaio de formação de biomassa de biofilme (cristal violeta). Assim, como resultado, obtiveram que tanto o extrato quanto o ácido, apresentaram atividade antiaderente significativa contra as cepas de *K. pneumoniae*.

5.3 ASSOCIAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORÉGANO E TOMILHO COM OS ANTIMICROBIANOS FRENTE A CEPAS *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Tendo em conta o estudo de associação dos OEs, foi realizada a junção do óleo essencial de orégano com os antimicrobianos testados a Ampicilina (AMP), Gentamicina (GEN), Ceftriaxona (CEF) e Ciprofloxacino (CIP), e da mesma forma foi realizada com o óleo essencial de tomilho.

Para o OE de orégano foi possível identificar que a AMP demonstrou efeito sinérgico (50%) e indiferente (50%); efeito sinérgico (33%) e indiferente (67%) com a GEN; e constatou

efeito indiferente (67%), sinérgico (16,5%) e antagônico (16,5%) na presença do CEF. Já com o CIP verificou-se efeito indiferente (50%), sinérgico (16,7%) e antagônico (33,3%).

Por sua vez, para o OE de tomilho verificou-se que a AMP demonstrou efeito sinérgico (67%) e indiferente (33%), a GEN apresentou efeito sinérgico (83,3%) e indiferente (16,7%), e CEF demonstrou efeitos sinérgicos (33,3%) e indiferentes (66,7%). Já, do CIP, constatou-se efeitos antagônicos (50%) e indiferentes (50%).

Sendo esse resultado alcançado a partir da observação comparativa do halo de inibição na presença do antibiótico, e com o halo de inibição na presença da associação dos antimicrobianos com o óleo essencial de orégano e tomilho (Tabela 8).

Tabela 8. Estudo da associação do óleo essencial de orégano e de tomilho com antimicrobianos sintéticos.

Microrganismo	Associação	AMP	GEN	CEF	CIP
Atcc 13883	HIATB	-	20mm	28mm	12mm
	HIATB + OEO	-	20mm (*)	28mm (*)	30mm (↑)
	HIATB + OET	-	20mm (*)	28mm (*)	12mm (*)
Kp101	HIATB	-	20mm	26mm	24mm
	HIATB + OEO	-	20mm (*)	26mm (*)	24mm (*)
	HIATB + OET	-	20mm (*)	26mm (*)	24mm (*)
Kp103	HIATB	-	18mm	26mm	12mm
	HIATB + OEO	-	20mm (↑)	26mm (*)	12mm (*)
	HIATB + OET	-	20mm (↑)	26mm (*)	8mm (↓)
Kp104	HIATB	10mm	16mm	12mm	28mm
	HIATB + OEO	-	20mm (↑)	22mm (↑)	12mm (↓)
	HIATB + OET	18mm (↑)	16mm (*)	20mm (↑)	22mm (↓)
Kp105	HIATB	12mm	20mm	24mm	36mm
	HIATB + OEO	18mm (↑)	20mm (*)	24mm (*)	30mm (↓)
	HIATB + OET	14mm (↑)	20mm (*)	26mm (↑)	34mm (↓)
Kp110	HIATB	20mm	20mm	28mm	30mm
	HIATB + OEO	20mm (*)	20mm (*)	26mm (↓)	30mm (*)
	HIATB + OET	20mm (*)	20mm (*)	28mm (*)	30mm (*)

HIATB: halo de inibição na presença do antibiótico. **OEO:** Óleo Essencial de Orégano. **OET:** Óleo Essencial de Tomilho. Efeito sinérgico (↑); efeito antagônico (↓); efeito indiferente (*).

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Nesse caso, verifica-se na literatura pesquisas como a de Rosato *et al.* (2020), na qual avaliaram os óleos essenciais de *Cinnammonum zeylanicum*, *Mentha piperita*, *Origanum vulgare*, e *Thymus vulgaris*, quanto ao seu efeito anti-biofilme e o sinergismo com antibióticos comuns como a gentamicina, norfloxacin e oxacilina. Então, a associação mostrou uma forte destruição do biofilme bacteriano e sinergismo de ação entre os OEs e os antibióticos avaliados. Sendo a interação da norfloxacin com OEs a mais eficaz entre todas as combinações testadas

de OE e antibiótico contra as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus epidermidis* IG4, e *Staphylococcus aureus* IG22. Corroborando com a presente pesquisa, da qual podemos observar que o óleo de orégano apresentou efeito sinérgico com a ampicilina e gentamicina e o óleo de tomilho apresentou efeito sinérgico com a ampicilina, gentamicina e ceftriaxona.

E, no estudo de associação de Uzair *et al.* (2017) foram investigados óleos essenciais com o potencial de inibir o crescimento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), isolados e em associação com a amoxicilina, um antibiótico da classe das penicilinas. Para realização do estudo foi aplicado o método de difusão em disco, a fim de avaliar a atividade de dez óleos essenciais extraídos de plantas tradicionais: *Thymus vulgaris* L, *Mentha pulegium*, *Ocimum sanctum*, *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis* L., *Cortex cinnamom*, *Citrus nobilis*, *Citrus deliciosa*, *Origanum vulgare* e *Mentha sp.* Como resultados, observaram que os óleos essenciais possuem tanto atividade bacteriostática, quanto bactericida maior do que a dos antibióticos sintéticos quando testados *in vitro*, com maior atividade para o óleo de tomilho e canela. E o orégano e a menta (*Mentha pulegium*) apresentaram forte atividade sinérgica com a amoxicilina. Os autores atribuem esse sinergismo do orégano devido ao alto teor de carvacrol em sua composição.

Magi *et al.* (2015), examinaram a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Lavandula angustifolia*, *Mentha piperita* e *Melaleuca alternifolia*, e do carvacrol, contra 32 cepas de *Streptococos* do Grupo A (GAS) resistentes à eritromicina e invasores de células, de forma isolada, e em associação com a eritromicina. De modo geral, observaram que os óleos essenciais de tomilho e orégano demonstraram a maior atividade antimicrobiana. E, através de ensaios quadriculados, obtiveram uma redução de 2 a 2.048 vezes da CIM da eritromicina, com sinergia confirmada para o carvacrol e a eritromicina.

Como também, na pesquisa de Miladi *et al.* (2017), foi avaliada a atividade antibacteriana e antibiofilme de cinco terpenos (constituintes de óleos essenciais): eugenol, carvacrol, timol, p-cimeno e γ -terpineno, separados e em associação com a tetraciclina, contra a *S. aureus* ATCC25923 e 12 cepas bacterianas orais coletadas da cavidade oral de crianças cariosas em 95 clínicas de odontologia. E obtiveram que os terpenos têm atividade antibiofilme e antibacteriana, aumentando sinergicamente o efeito da tetraciclina, especialmente sobre as cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* B193, *S. aureus* B285 e *S. 210 mutans* B509.

Enquanto Barbosa *et al.* (2021) analisaram a atividade dos terpenos: carvacrol e timol, determinando a CIM e a associação destes com o antimicrobiano Norfoxacina e com o Brometo de etídio contra as cepas de *Staphylococcus aureus* (SA-1199- selvagem e SA-1199B-

superexpressa NorA). Dessa maneira, o carvacrol e o timol apresentaram CIM de 256 µg/mL sobre as cepas testadas. E tanto o carvacrol, quanto o timol potencializaram a atividade da Norfoxacina e Brometo de etídio, reduzindo a CIM da Norfoxacina. Portanto o carvacrol e timol atuaram de forma sinérgica com a norfoxacina sobre as cepas de *S. aureus*.

E também, Silveira *et al.* (2020), verificaram a atividade antibacteriana e a reversão da bomba de efluxo com o uso do timol e do carvacrol (constituintes do óleo de tomilho) contra a cepa de *Staphylococcus aureus*, comparada com a atividade da tetraciclina (antibiótico comercializado), bem como sua toxicidade contra *Drosophila melanogaster*. E identificaram uma CIM de 72 µg/mL para o timol, 256 µg/mL para o carvacrol e 128 µg/mL para a tetraciclina. Quanto a associação entre o timol e a tetraciclina foi demonstrado sinergismo, enquanto a associação entre carvacrol e tetraciclina apresentou antagonismo.

Levando em conta antimicrobiano, Santana *et al.* (2020), com o propósito de avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial da Lavandula Híbrida Grosso associado com a gentamicina contra cepas de *S. aureus* utilizou a técnica de microdiluição em caldo para obtenção da CIM e posterior estudo de associação. Dessa forma, obteve uma CIM de 128 µg/mL para a cepa em análise e observou um efeito sinérgico ao se associar a gentamicina com o óleo essencial da Lavandula Híbrida Grosso, corroborando com a pesquisa atual.

Por fim, no estudo de associação de Aguiar *et al.* (2019), buscou-se avaliar a eficácia da combinação dos OEs de canela, orégano, tomilho comum e tomilho vermelho; como também dos principais componentes desses OEs (cinamaldeído, carvacrol e timol) com antimicrobianos (AMBs) convencionais (oxitetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina e penicilina) contra a cepa de *S. suisstrains*. Para tal, foi utilizado o método *checkerboard* no intuito de analisar a interação dos OEs com os AMBs, pela determinação do índice de concentração inibitória fracionada. Como resultado obtiveram que todos os AMBs apresentaram efeito sinérgico ou aditivo com pelo menos um dos quatro óleos essenciais. E, ainda, foi possível coletar que a combinação dos AMBs com os OEs apresentou melhores resultados do que a combinação dos AMBs com os componentes principais dos OEs, embora não tenham sido detectados efeitos antagonistas em nenhum caso.

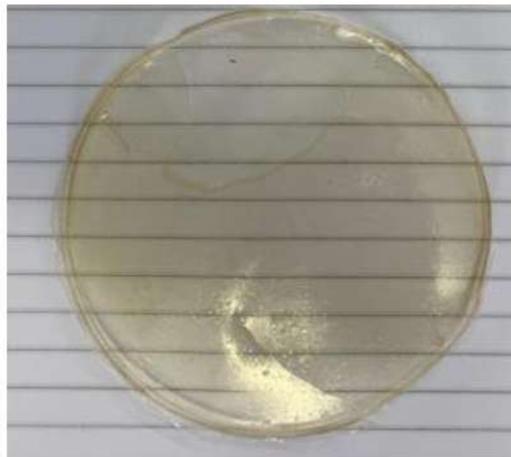
5.4 PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS

Foi realizado um teste experimental exploratório para o estabelecimento das condições a serem utilizadas no desenvolvimento das membranas.

Na Figura 11 é apresentada a imagem de uma membrana resultado da metodologia de preparação de membrana por evaporação de solvente, conforme descrito no apêndice A. As membranas produzidas por essa metodologia apresentavam composição de quitosana de médio peso e OE de orégano na concentração de 4%, com ou sem tween. E foi possível observar que as membranas ficaram com estrutura quebradiça. Portanto, era impossível fazer a retirada da placa sem comprometer a estrutura da membrana.

Em seguida, foi realizado o teste de evaporação do solvente de forma natural, sem submissão a secagem na estufa, portanto com secagem a temperatura ambiente. Porém as membranas não secaram em um intervalo de 20 dias, sendo assim, ficou inviável o seguimento com essa metodologia.

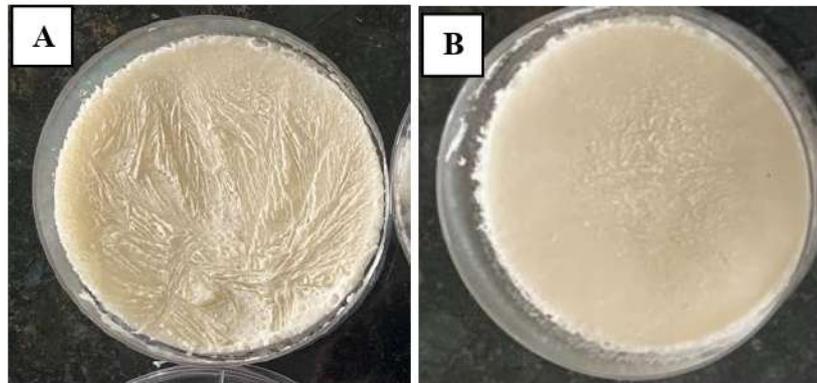
Figura 11. Aspecto macroscópico da membrana de quitosana e OEO confeccionada por evaporação de solvente



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

De acordo com essas observações, ajustes foram necessários e realizados no estabelecimento das metodologias de desenvolvimento das membranas, desde o procedimento de confecção, passando-se a utilização a liofilização, até a avaliação de qual quitosana utilizar - médio peso ou alto peso. Na Figura 12 é possível observar essas membranas com composição de quitosana de médio peso ou alto peso, com OE de orégano na concentração de 4%.

Figura 12. Membranas confeccionada por liofilização com quitosana de alto peso e médio peso com OE de orégano na concentração de 4%

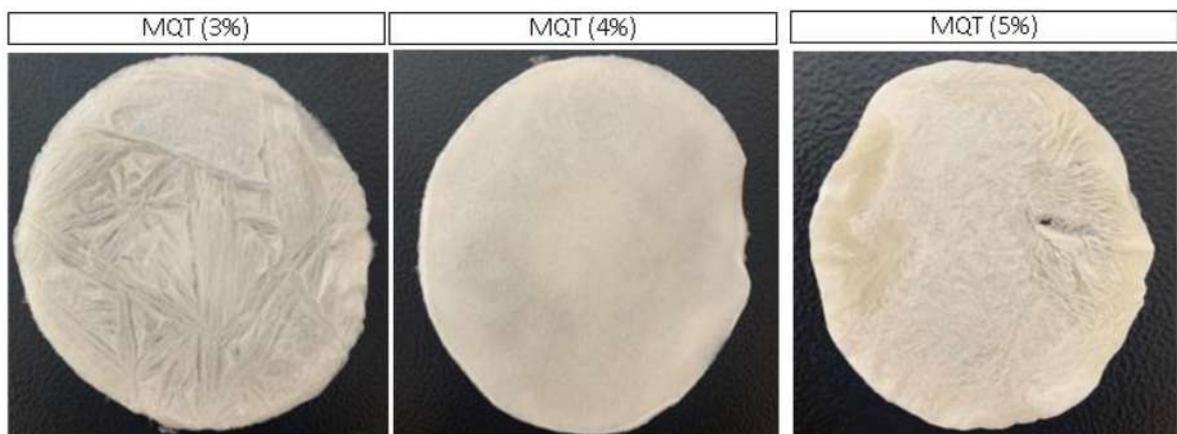


Legenda: A- membrana com quitosana de alto peso; B- membrana com quitosana de médio peso.
Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Considerando o peso molecular da quitosana, observa-se que a membrana confeccionada com a quitosana de alto peso apresentou menor homogeneidade, e estrutura cristalizada. Portanto, adotou-se o uso da quitosana de médio peso.

Dessa maneira, o próximo passo foi confeccionar membranas com diferentes concentrações de OEs de orégano e tomilho com ou sem tween. Assim, foram produzidas membranas em concentrações de 3%, 4% e 5%, com os OEs de orégano e tomilho isolados, e em concentrações de 6%, 8% e 10% com OEs de orégano e tomilho juntos, e com OEs de orégano e tomilho juntos e adição de tween. Na Figura 13, é possível observar como exemplo as membranas de quitosana com OE de tomilho, nas concentrações de 3%, 4% e 5%.

Figura 13. Membranas de quitosana com tomilho a 3%, 4% e 5%

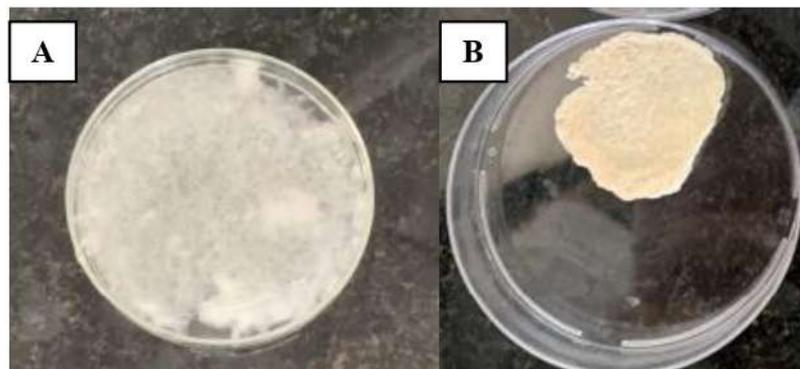


Fonte: Dados da pesquisa (2023)

5.5 NEUTRALIZAÇÃO

O processo de neutralização foi iniciado utilizando-se a metodologia de submersão em NaOH. Porém foi possível observar que essa metodologia não pode ser aplicada a membranas produzidas por liofilização. Uma vez que, a membrana perdeu sua estrutura e apresentou consistência em forma de hidrogel, quando submersa em NaOH. Além disso, posteriormente ao procedimento de secagem em estufa as membranas exibiram diminuição do seu diâmetro, espessura e volume, bem como retração considerável (Figura 14).

Figura 14. Membrana produzida por liofilização submetida a neutralização por submersão em NaOH e secagem



Legenda: A- membrana com quitosana submetida a neutralização por submersão em NaOH; B- membrana com quitosana submetida a liofilização após neutralização por submersão em NaOH.
Fonte: Dados da pesquisa (2023)

De acordo com essas observações passou-se a utilizar o procedimento de neutralização da membrana por meio gasoso, com Hidróxido de amônio (NH_4OH) (Figura 15).

Figura 15. Membrana produzida por liofilização submetida a neutralização por meio gasoso, com hidróxido de amônio (NH_4OH).



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Dessa maneira, ficou estabelecido que a melhor forma de neutralizar as membranas é por meio gasoso.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

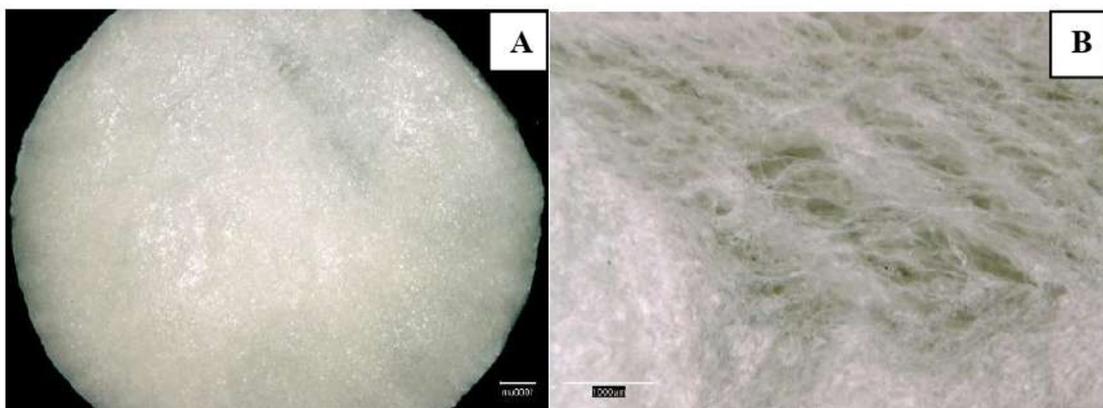
A partir dos ajustes realizados, são apresentados nesta seção as análises referente a estrutura química, física e biológica das membranas de quitosana incorporadas com os OEs.

5.6.1 Microscopia Ótica (MO)

A Microscopia Ótica (MO) foi empregada com o objetivo de avaliar a morfologia da superfície e os aspectos macroscópicos das membranas de quitosana incorporadas com óleo essencial e sem óleo essencial.

Na Figura 16A é possível observar a membrana de quitosana incorporada apenas com óleo essencial de orégano a 4% apresentando superfície rugosa e aspecto homogêneo. Na Figura 16B é possível observar a estrutura porosa, dando a característica esponjosa da membrana, o que denota uma capacidade de absorção do exsudato.

Figura 16. Imagens de Microscopia Ótica de membrana de quitosana incorporada com óleo essencial de orégano a 4%



A. 1000µm com magnificação de 6x; B. 1000µm com magnificação de 50x

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

E na Figura 17A é possível observar a membrana de quitosana incorporada apenas com óleo essencial de tomilho a 4% apresentando superfície rugosa e aspecto homogêneo. Na Figura

17B é possível observar a estrutura porosa, com poros uniformes e interconectados dando a característica esponjosa da membrana, o que denota uma capacidade de absorção do exsudato.

Figura 17. Imagens de Microscopia Ótica de membrana de quitosana incorporada com óleo essencial de tomilho 4%

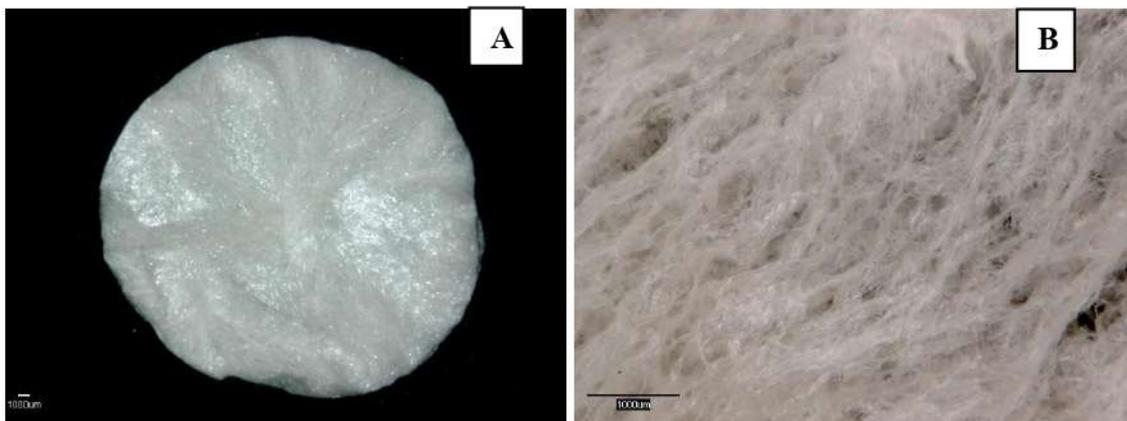


A. 1000µm com magnificação de 20x; B. 500µm com magnificação de 50x.

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Na Figura 18A é possível observar a membrana de quitosana incorporada com óleo essencial de orégano (4%) e tomilho (4%) apresentando superfície rugosa e aspecto homogêneo. Na Figura 18B é possível observar a estrutura porosa, com poros interconectados dando a característica esponjosa da membrana, o que denota uma capacidade de absorção do exsudato.

Figura 18. Imagens de Microscopia Ótica de membrana de quitosana incorporada com óleo essencial de orégano (4%) e tomilho (4%)



A. 1000µm com magnificação de 6x; B. 1000µm com magnificação de 50x.

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Dessa maneira, não foram observadas diferenças morfológicas entre as membranas incorporadas com diferentes óleos. Ainda, pode-se verificar que sua apresentação é homogênea o que indica uma incorporação bem sucedida dos óleos na matriz de quitosana. E quanto sua estrutura, é contínua, portanto, não foram identificadas rupturas após secagem.

Segundo Xie *et al.* (2017), a porosidade possui relevância para aplicação sobre lesões com exsudato uma vez que permite a penetração de fluidos biológicos. Dessa forma, em seu estudo, eles desenvolveram um curativo composto por colágeno, quitosana e alginato pela técnica de liofilização para aplicação em lesões e obtiveram uma superfície lisa e estrutura almofadada com porosidade.

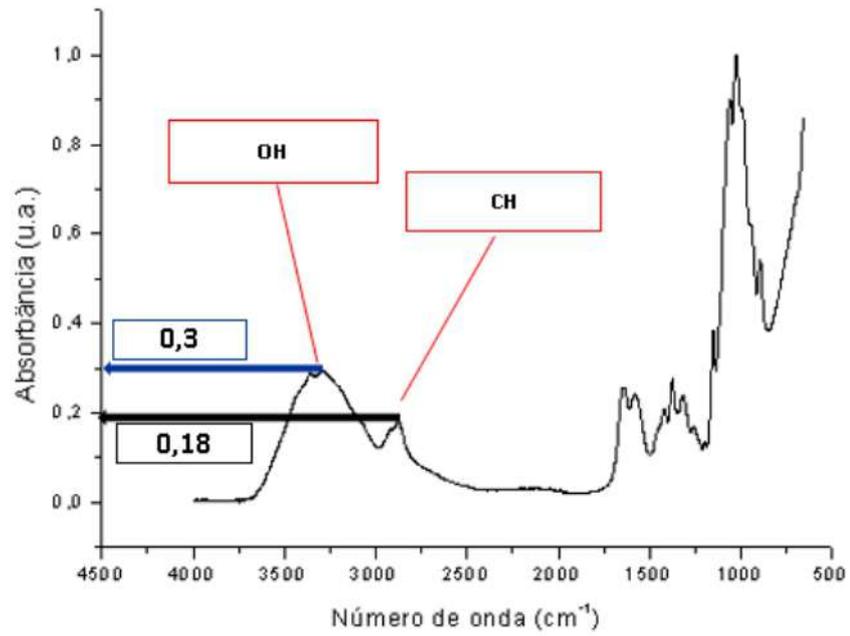
E Zhou *et al.* (2021), por sua vez, respalda a importância da estrutura porosa para a absorção do exsudato, e complementa que essa estrutura também é relevante na elaboração de curativos por permitir as trocas gasosas e manutenção de um ambiente úmido, o que é de extrema importância para reparação das lesões. Outra característica importante, refere-se à homogeneidade, pois de acordo com Valencia *et al.* (2018) essa estrutura porosa e homogênea pode promover a proliferação celular.

5.6.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR foi utilizada com o objetivo de identificar os espectros (bandas características dos grupos funcionais) da quitosana, OE de orégano, OE de tomilho e da quitosana com os OEs de orégano e tomilho isolados e em conjunto.

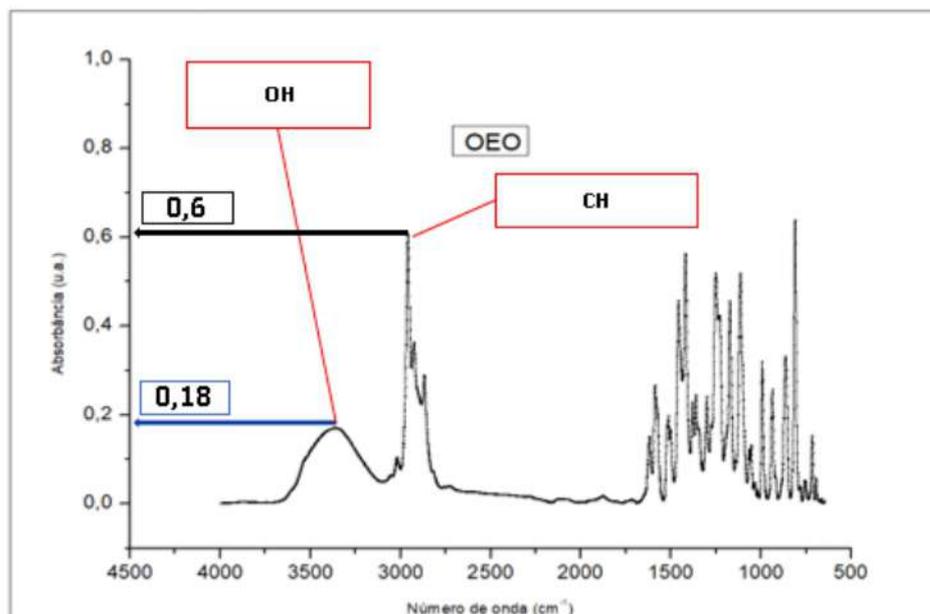
Os espectros de FTIR na faixa de 4000–500 cm^{-1} são apresentados nas Figuras 19,20,21,22,23, e 24 e é possível observar a presença das bandas características do polímero de quitosana em 3353, 2933, 2873 cm^{-1} atribuídas as vibrações de estiramento dos grupos funcionais -OH, -CH₂ e -CH₃ (DIMARTINO *et al.*, 2017).

Figura 19. Espectro de FTIR da quitosana

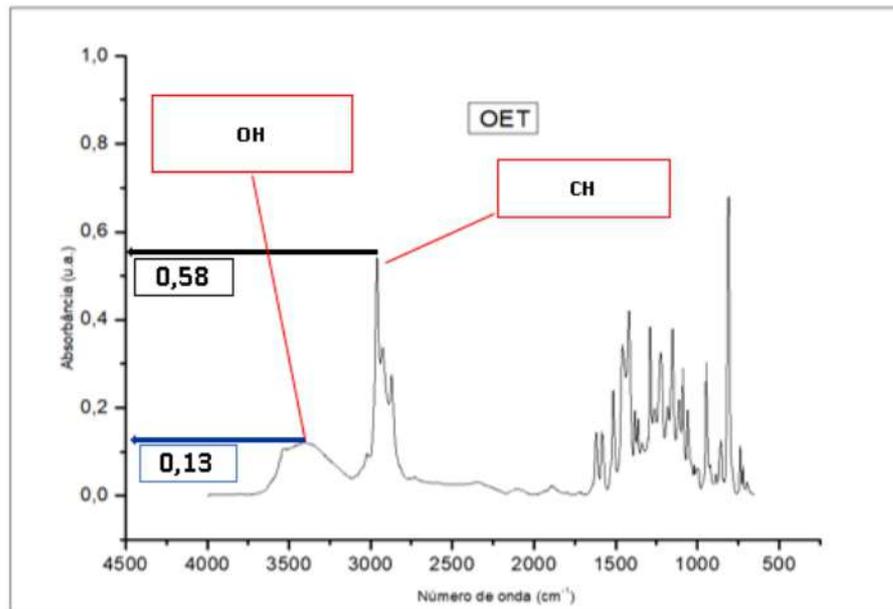


Fonte: Dados da pesquisa (2023)

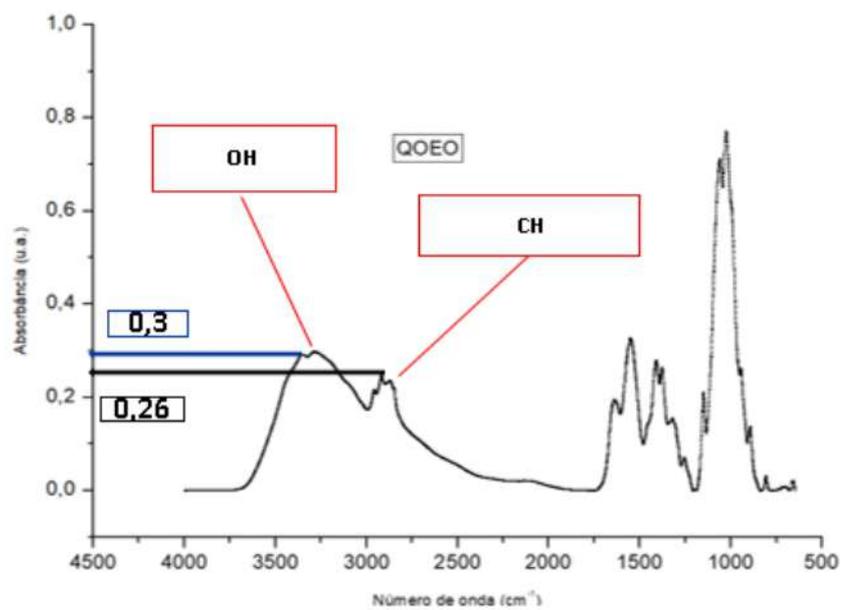
Figura 20. Espectro de FTIR do OEO



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

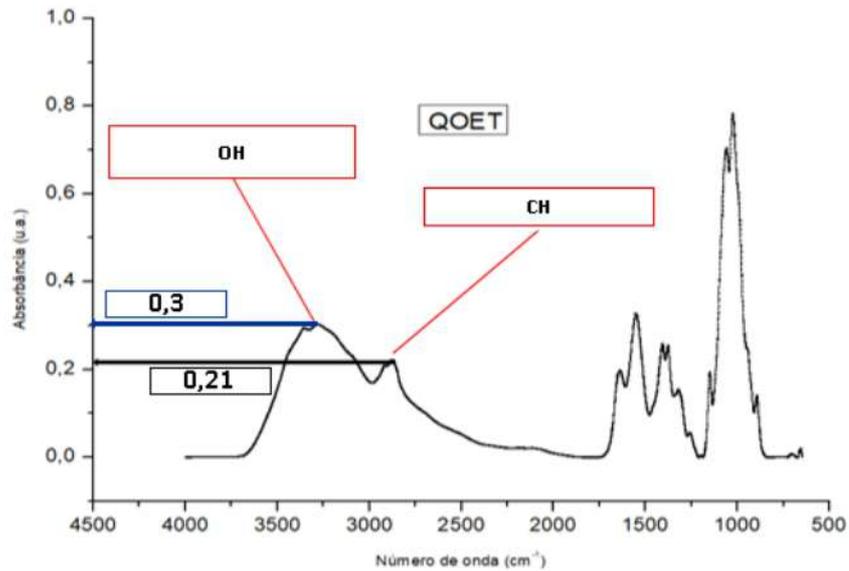
Figura 21. Espectro de FTIR do OET

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Figura 22. Espectro de FTIR da QOEO

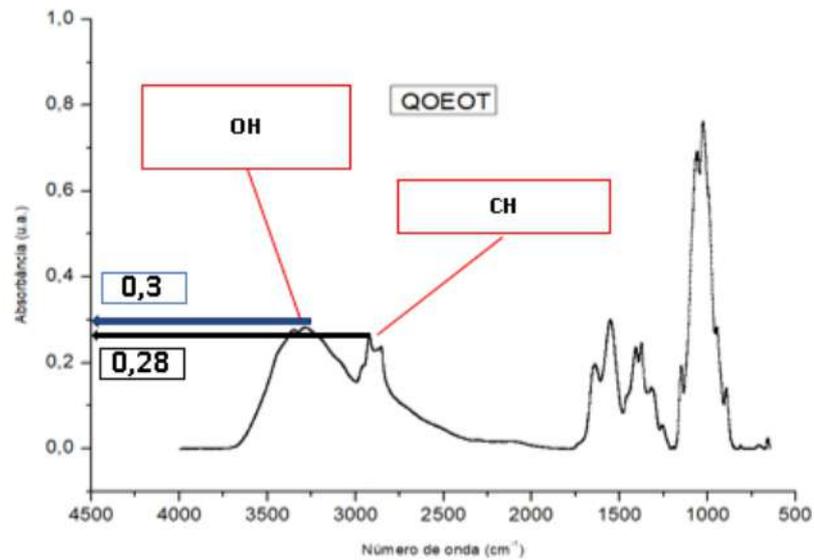
Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Figura 23. Espectro de FTIR da QOET



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Figura 24. Espectro de FTIR da QOEOT



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

O grupo amino possui uma banda de absorção característica na região de 3400-3500 cm^{-1} , que está também sobreposta pela banda de absorção decorrente do grupo -OH. Além disso, apresenta uma banda característica da deformação angular do CH_2 que aparece na região de 1421 cm^{-1} . As bandas características de 1650 cm^{-1} e 1575 cm^{-1} correspondem ao modo de

vibração por estiramento através da ligação de $-C=O$ da amida I com a deformação da ligação N-H, conjuntamente com o estiramento da ligação C-N da amida II, respectivamente. As bandas de absorção da região de 1151 e 896 cm^{-1} (estiramento de ligações C-O-C) como as da região 1060 e 1025 cm^{-1} (vibrações de estiramento do grupo C-O) são características da estrutura sacarídea da quitosana (SHANMUGASUNDARAM, RAVIKUMAR E BABU, 2004; WANG, 2013).

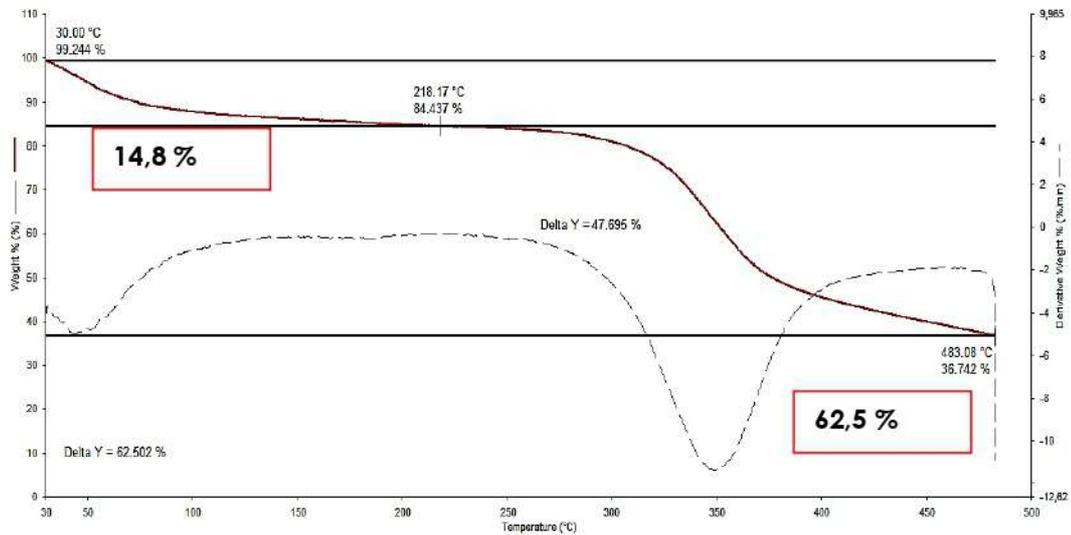
Este espectro é então característico da quitosana e encontra-se de acordo com Masood *et al.* (2019), pois apresenta todas as absorções relativas a esse polímero, com um espectro aproximado ao da amostra do pesquisador citado. Além disso, foram claramente identificadas nas membranas, incorporadas com os OEs, as bandas de absorção características dos óleos essenciais de orégano e tomilho e, portanto, as análises dos espectros indicaram a incorporação bem sucedida do OEs.

5.6.3 Termogravimetria (TGA)

A utilização da análise de termogravimetria na caracterização de polímeros está pautada no estudo da estabilidade e decomposição térmica dos mesmos. Essa análise foi realizada com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica das membranas e o comportamento da quitosana após a adição dos OEs.

A Figura 25 ilustra as curvas termogravimétricas para as membranas de quitosana. A partir dos resultados observou-se a presença de duas curvas de perda de massa do material, na primeira etapa houve uma perda de 14,8 % referente a perda de água, no intervalo de temperatura entre 30°C e 218,7°C e, na segunda etapa um percentual de perda de 47,69 %, entre 218,7°C e 483,08°C caracterizada pela degradação térmica total da amostra ou formação de cinzas.

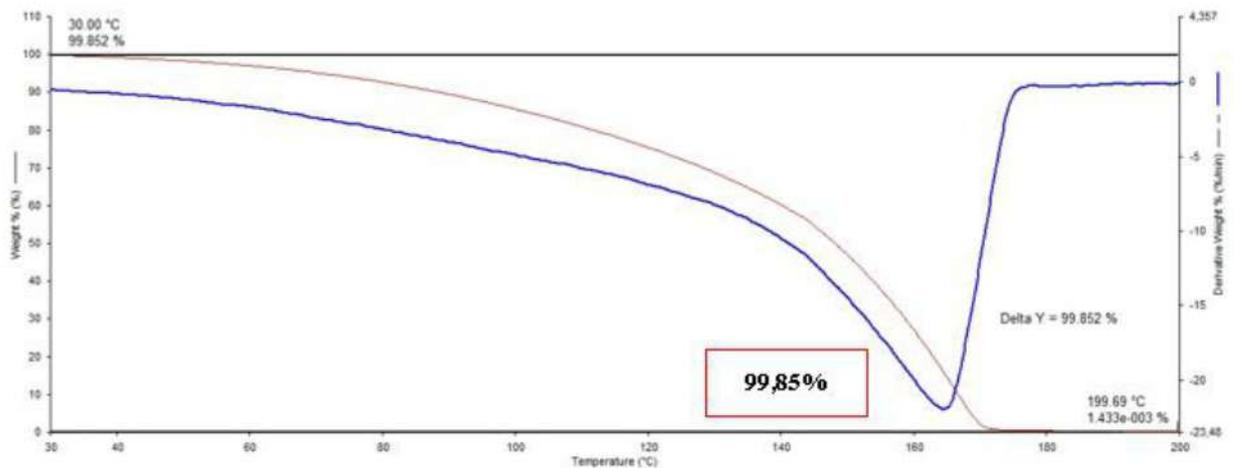
Figura 25. Curva termogravimétricas de perdas da quitosana



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

A Figura 26 ilustra as curvas termogravimétricas para o óleo essencial de orégano. É possível perceber que ocorre uma variação da massa dos componentes em função da temperatura e entre 160°C e 180°C tem-se uma perda total de massa de 99,85%.

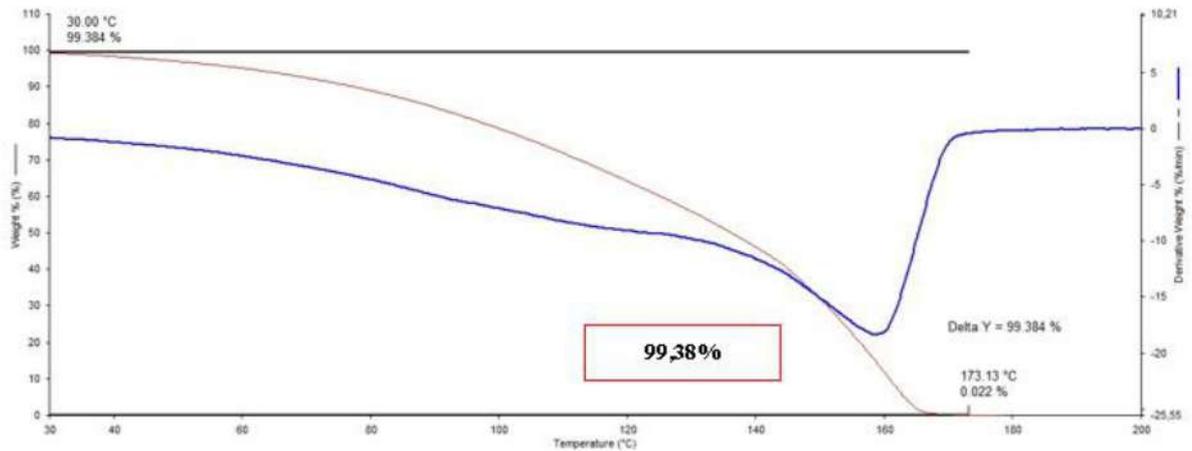
Figura 26. Curva termogravimétricas de perdas do OE de orégano



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

A Figura 27 ilustra as curvas termogravimétricas do óleo essencial de tomilho. É possível perceber que ocorre uma variação da massa das substâncias em função da temperatura e entre 150°C e 180°C tem-se uma perda total de massa de 99,38%.

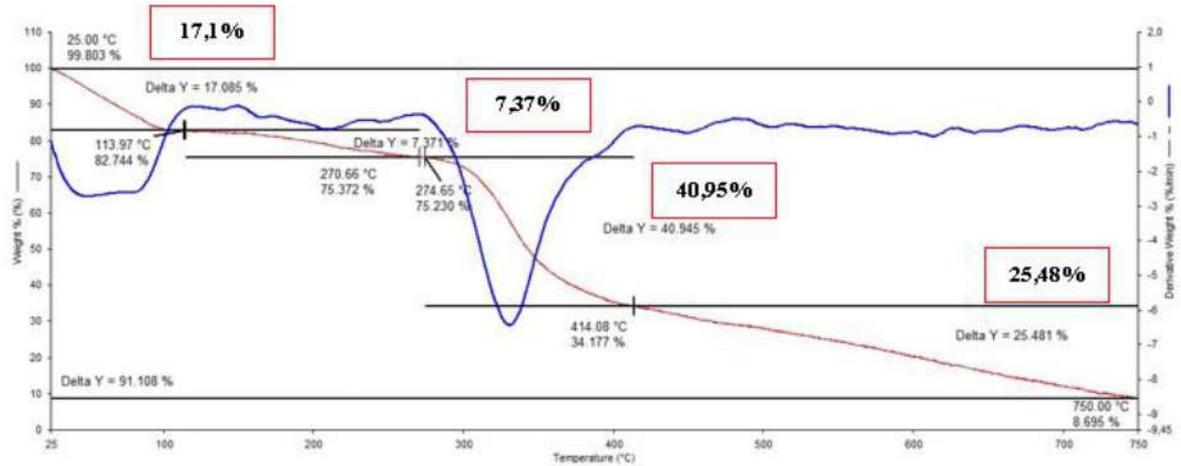
Figura 27. Curva termogravimétricas de perdas do OE de tomilho



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Na Figura 28 é possível observar quatro etapas significativas de perda de massa para as membranas de OE de orégano a 4%. A primeira perda entre 25° e 99 °C, de 17,1%, referente a perda de água; a segunda perda ocorreu entre 114° e 271°C, de 7,37%, caracterizado pela decomposição da cadeia molecular da quitosana; a terceira perda de massa compreendida entre 275° e 414°C de 40,95%, atribuída, possivelmente, as degradações térmicas da membrana; e a quarta perda ocorrendo entre 414° e 750 °C, de 25,48%, atribuída a carbonização do material, totalizando uma perda total de massa de 91,11%.

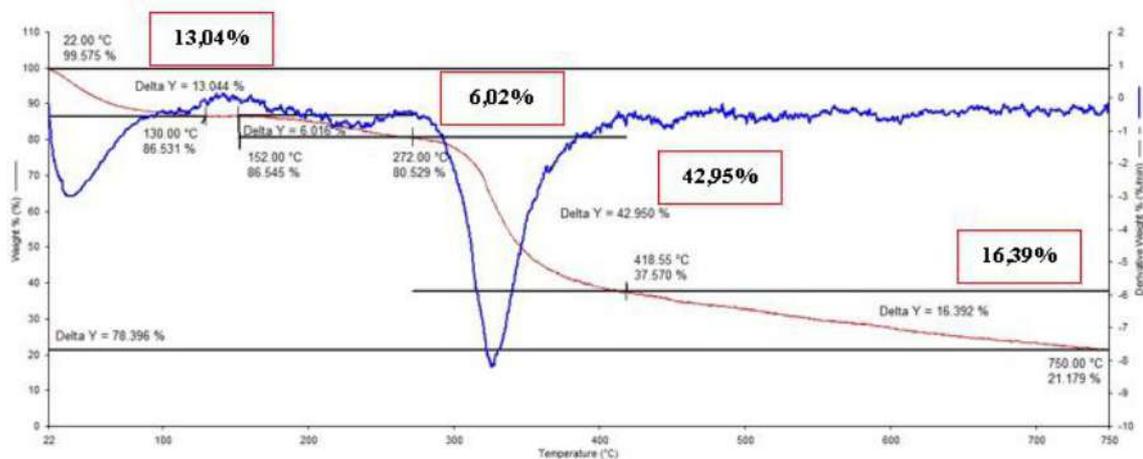
Figura 28. Curva termogravimétricas da membrana do OE de orégano a 4%



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Na Figura 29 é possível observar quatro etapas significativas de perda de massa para a membrana de OE de tomilho a 4%. A primeira perda entre 22° e 99,58 °C, de 13,04%, associada a perda de água; a segunda perda ocorreu entre 152° e 272°C, de 6,02%, atribuída, a decomposição da cadeia molecular da membrana; a terceira perda de massa compreendida entre 272° e 418,5°C de 42,95%, referente degradação térmica; e a quarta perda ocorrendo entre 418,5° e 750 °C, de 16,39%, sinalizando a carbonização do material, que totaliza uma perda total de massa de 78,40%.

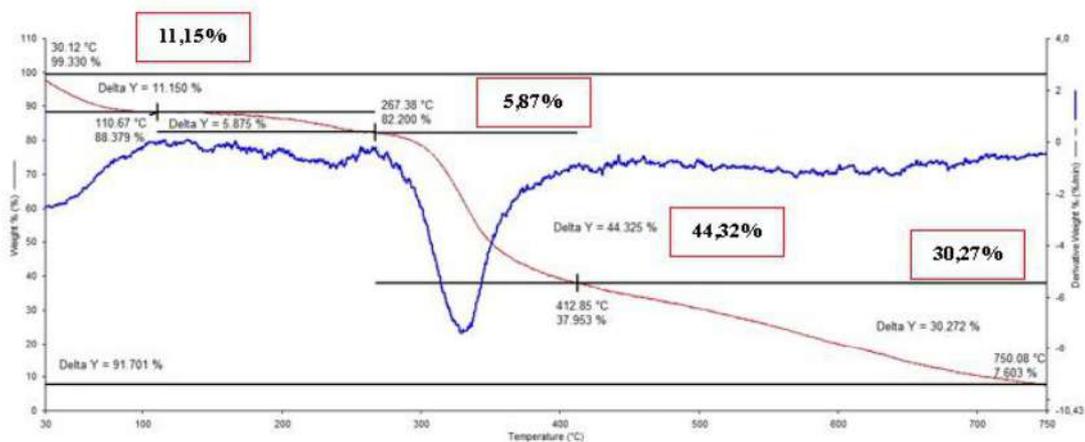
Figura 29. Curva termogravimétricas da membrana do OE de tomilho a 4%



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Na Figura 30 é possível observar quatro etapas significativas de perda de massa para a membrana com OE de orégano 4% e OE de tomilho a 4%. A primeira perda entre 30,12° e 99,33 °C, de 11,15%, atribuída a perda de água; a segunda perda ocorreu entre 110° e 267,38°C, de 5,87%, é atribuída a decomposição da cadeia molecular da membrana; a terceira perda de massa compreendida entre 267,38° e 412,85°C de 44,32%, referente a degradação térmica; e a quarta perda ocorrendo entre 412,85° e 750 °C, de 30,27%, sinalizando a degradação total do material, com uma perda total de massa de 91,70%.

Figura 30. Curva termogravimétricas da membrana com OE de orégano 4% e OE de tomilho a 4%



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Dessas análises é possível observar que a membrana composta pelos OEs de orégano 4% e tomilho 4% apresentaram uma perda de massa sob maior temperatura, a 30,12° e de modo geral a temperatura final de perda de massa foi de aproximadamente 750°C.

Entretanto, Altiok *et al.* (2010), ao confeccionarem filmes de quitosana incorporados com OE de tomilho observaram que a primeira perda de massa, caracterizada pela evaporação de solvente, ocorreu apenas a 100°C. Enquanto Castro *et al.* (2021), em seu estudo analisaram filmes de quitosana puros e filmes de quitosana com óleo essencial de melaleuca, e para a análise térmica dos filmes (apenas de quitosana), eles observaram uma degradação em três estágios, o primeiro iniciando a 50° e 110° C, e correlacionou com a evaporação do solvente. O segundo estágio iniciando a 220°C, o que é causado pela desidratação do material. Finalmente, o terceiro estágio, que começou a 320° C, e relacionou à perda de ligações glicosídicas na quitosana.

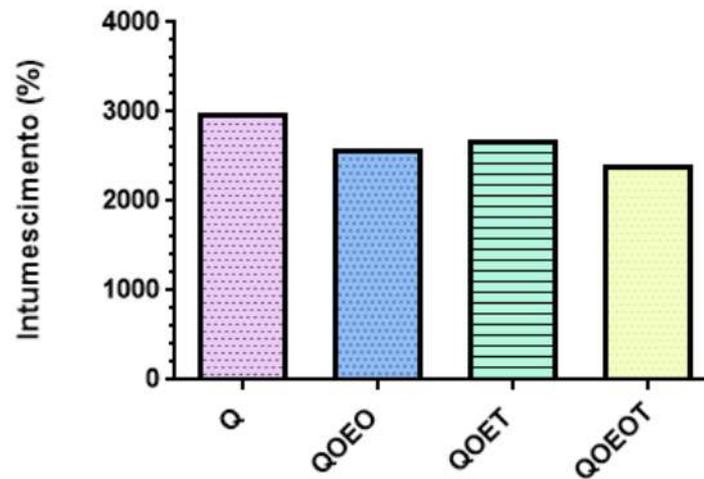
Desse mesmo estudo, para o filme composto com OE de melaleuca, Castro *et al.* (2021), observaram uma degradação em quatro estágios. Sendo o primeiro entre 50° e 100°C devido à evaporação da água e do ácido acético. No segundo estágio entre 190° e 250°C, observou-se degradação em frações da quitosana, como também perda de compostos voláteis do óleo essencial e decomposição da cadeia lateral do álcool poli vinílico (PVA). Enquanto o terceiro estágio de degradação ocorre entre 250° e 300°C e reflete a degradação dos anéis de sacarídeos e decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas da quitosana. Por fim, o quarto estágio ocorre entre 440° e 500 °C e está associado a degradação dos resíduos de polietileno do PVA. Assim, corroborando com o presente estudo pelo número de estágios de perdas e aproximando-se dos intervalos de temperatura correspondentes a cada perda.

Também, observando os picos de perda de massa, Sánchez-González *et al.* (2010), obtiveram, para filmes de quitosana com óleo essencial de bergamota, um pico de perda de massa elevado no intervalo de temperatura entre 300° e 350°C, e associam essa perda aos componentes voláteis do óleo essencial como monoterpenos e sesquiterpenos da matriz polimérica.

5.6.4 Grau de intumescimento

Este ensaio foi realizado no intuito de investigar o comportamento do material durante a imersão e permanência em solução aquosa simulando o meio interno do organismo. A Figura 31 apresenta os resultados do grau de intumescimento para as membranas de quitosana (Q), quitosana com OEO a 4% (QOEO), membranas de quitosana com OET a 4% (QOET), e membranas de quitosana com OE de orégano e tomilho a 8% (QOET).

Figura 31. Grau de Intumescimento das membranas de quitosana e quitosana com os OEs



Legenda: Q- Quitosana; QOEO- Quitosana e óleo essencial de orégano; QOET- Quitosana e óleo essencial de tomilho; QOEOOT- Quitosana e óleo essencial de orégano e tomilho
 Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Os resultados apresentados no gráfico expõem um menor grau de intumescimento para as membranas contendo os dois óleos essenciais e, portanto, as maiores concentrações. No entanto, é possível observar uma alta capacidade de intumescimento das membranas, de forma geral, ultrapassando uma taxa de 2200 % de intumescimento.

Nesse sentido, Tomaz (2018) confeccionou membranas de quitosana incorporadas com naftoquinona por liofilização e observou que a maioria das membranas apresentou um grau de intumescimento de 1700% e concluiu que as membranas apresentam elevada capacidade de absorção.

Lucena (2020), afirma que a hidrofiliabilidade do seu material pode ser atribuída aos grupos polares presentes no material, assim corrobora com o resultado do presente estudo, uma vez que, as membranas que apresentam menor quantidade de material hidrofóbico (óleo essencial), demonstram maior grau de intumescimento.

Ainda é possível ratificar esse resultado pelo potencial de solubilidade, pois, de acordo com Bona (2017), o índice de intumescimento está diretamente relacionado à solubilidade em água, portanto as membranas com maior quantidade de OE apresentaram menor grau de intumescimento.

5.6.5 Biodegradação Enzimática

O objetivo do ensaio de Biodegradação Enzimática é simular a biodegradação do biomaterial em meios biológicos e por isso, utilizou-se do meio PBS como grupo controle e Lisozima/ PBS como grupo experimental.

A Tabela 9 ilustra a degradação das membranas de quitosana, com OE de orégano a 4%, membranas de quitosana com OE de tomilho a 4%, e membranas de quitosana com OE de orégano e tomilho 8%.

Tabela 9. Perda de massa percentual das membranas de quitosana e quitosana com os OEs

Membranas	Perda de massa das membranas 1,7 e 14 dias					
	PBS			LISOZIMA/PBS		
	1 dia	7 dias	14 dias	1 dia	7 dias	14 dias
Q	2,04	10,08	18,00	4,00	12,04	21,00
QOEO 4%	5,51	11,09	21,91	8,68	15,50	27,75
QOET 4%	4,79	12,41	23,21	11,15	17,42	30,44
QOEO 8%	10,44	20,05	37,04	12,92	28,29	42,79

Legenda: Q- Quitosana; QOEO- Quitosana e óleo essencial de orégano; QOET- Quitosana e óleo essencial de tomilho; QOEO 8% - Quitosana e óleo essencial de orégano e tomilho
Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Verifica-se que, tanto para as membranas imersas em PBS, quanto para as imersas em solução lisozima/PBS, houve uma perda de massa crescente com o passar dos dias. E em relação a solução na qual as membranas foram submersas é possível perceber que as membranas submersas em lisozima/PBS apresentaram uma perda de massa levemente superior. Ainda, é possível identificar que as membranas contendo os dois óleos perderam mais massa em relação aquelas que continham apenas um dos óleos. E as membranas de tomilho apresentaram uma perda de massa um tanto superior em relação as membranas de orégano.

Dessa forma, corrobora com o resultado, Ceylan (2021), que em seu estudo obteve que a degradação das membranas aumenta com o aumento do tempo de incubação até o 9º dia. Como também, corrobora com Lucena (2020) que confeccionou tubos de quitosana e obteve que em todas as amostras a degradação foi mais acentuada sob a ação da lisozima.

Já Habiba *et al.* (2019) em seu estudo confeccionou membranas de nanofibra de quitosana/álcool polivinílico/TiO₂ fabricados por eletrofiação, e observaram que a membrana

permaneceu estável e inalterada em sua forma em água destilada até 162 h, sendo observada uma perda de 12,5% apenas às 258h. Já, em meio ácido, a membrana ficou estável até 93h, e então foi iniciada a degradação com perda de peso de 80% em 258 h. No presente estudo as membranas apresentaram perda de massa no intervalo de 24h.

Por fim, deve-se considerar que a degradação de biopolímeros é uma propriedade dependente da estrutura física e química do polímero (morfologia, grau de reticulação, pureza, porosidade, resistência mecânica e térmica, peso molecular), como também pela influência de outros fatores como o pH, a temperatura, umidade, presença ou ausência de oxigênio, que influenciam também no potencial de ação da atividade enzimática (KUMAR; MAITI, 2016; BALAJI *et al.*, 2017).

5.6.6 Atividade antibacteriana das membranas de quitosana e membranas de quitosana incorporadas com óleo essencial de orégano e óleo essencial de tomilho

O teste da atividade antibacteriana foi realizado com as membranas de quitosana e quitosana com óleo essencial (tomilho e/ou orégano) incorporadas contra cepas da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, pela metodologia de difusão em ágar por disco e poço.

A Tabela 10 ilustra as medidas dos halos típicos de inibição do crescimento bacteriano produzidos pela ação das membranas de quitosana, quitosana com OE de orégano ou tomilho a 4%, e membranas de quitosana com OE de orégano e tomilho 8%.

Tabela 10. Atividade antibacteriana das membranas de quitosana e membranas de quitosana incorporadas com óleo essencial de orégano e óleo essencial de tomilho

Membranas	HI- 24h
Q	14mm
QOEO 4%	14mm
QOET 4%	16mm
QOEOT 8%	14mm

Legenda: HI- Halo de inibição; Q- Quitosana; QOEO- Quitosana e óleo essencial de orégano; QOET- Quitosana e óleo essencial de tomilho; QOEOT- Quitosana e óleo essencial de orégano e tomilho

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

De acordo com o resultado do teste antibacteriano com cepas de *K. pneumoniae* pode-se observar que tanto a quitosana pura, quanto a quitosana incorporada com óleos essenciais apresentam atividade antibacteriana.

A *K. pneumoniae* foi considerada mais sensível à membrana incorporada com óleo essencial de tomilho. Esse micróbio é um bacilo Gram-negativo, da família *Enterobacteriaceae*, que pode ser encontrado colonizando a orofaringe e fezes de pessoas saudáveis, ou como um oportunista no organismo de pessoas imunocomprometidas, levando aos quadros de infecção (SEIBERT *et al.*, 2014). E, no presente estudo, todas as membranas apresentaram atividade sobre essa cepa corroborando com o estudo de Deineka *et al.*, (2021) que observaram que a formulação de quitosa aerogel foi mais eficaz contra bactérias gram-negativas do que sobre bactérias gram-positivas.

Já, Koosehgol *et al.* (2017), desenvolveram filmes de quitosana com fumarato de polietileno glicol (PEGF), e timol, e, em seguida, avaliaram a ação antibacteriana, observando uma considerável atividade contra bactérias gram-negativas e gram-positivas. Ainda, notaram que à medida que a concentração de timol aumentava, maior era a atividade antibacteriana. Então, relacionaram essa atividade com a liberação lenta de algumas quantidades de timol que está fisicamente preso entre cadeias reticuladas de quitosana e PEGF.

Considerando as observações de Altiok *et al.* (2010), o presente estudo e os estudos acima relatados utilizam um ambiente ideal quanto a composição do meio, pH e temperatura para o crescimento de microorganismos e realização dos testes antimicrobianos. Dessa forma, representando, possivelmente, um cenário com maior número de microorganismos que o encontrado em LPPs infectadas. Assim sendo, pode-se esperar uma maior atividade antimicrobiana das membranas em casos de LLPs infectadas.

6 CONCLUSÕES

A partir da metodologia proposta e realizada, por meio de uma comparação, até o presente momento, é possível concluir que:

- Os compostos majoritários dos óleos essenciais foram: o carvacrol, para o OE de orégano, e o para-cimeno e timol, para o OE de tomilho;
- Os óleos essenciais de orégano e de tomilho apresentaram forte atividade antimicrobiana sobre cepas de *K. pneumoniae*;
- Os óleos essenciais de orégano e de tomilho apresentaram atividade bactericida sobre a maioria das cepas de *K. pneumoniae*;
- O óleo essencial de orégano, o óleo essencial de tomilho, e o digluconato de clorexidina 0,12% não conseguiram inibir a formação de biofilme nas proporções testadas;
- Com relação a associação do uso de antibióticos já comercializados com o óleo de orégano, foi possível identificar maior efeito sinérgico quando associado a ampicilina. Enquanto o óleo de tomilho apresentou maior efeito sinérgico quando associado à gentamicina;
- Para produção das membranas a quitosana mais adequada ao objetivo foi a de médio peso, seguindo a metodologia de liofilização, portanto resultando na produção de membranas porosas;
- E voltando-se para a etapa de neutralização, para garantir melhor estrutura da membrana, a metodologia mais adequada é por meio gasoso com hidróxido de amônio (NH₄OH).
- Pela Microscopia ótica foi possível perceber que as membranas de quitosana apresentaram aspecto homogêneo o que indica uma incorporação bem sucedida dos óleos na matriz de quitosana. E estrutura contínua, portanto, não apresentou rupturas após secagem.
- Os espectros (FTIR) indicaram que a incorporação dos OEs de orégano e tomilho nas membranas de quitosana foi bem sucedida.
- As membranas apresentam alta capacidade de intumescimento e biodegradação adequada para a aplicação como curativos.
- As membranas apresentam capacidade de inibição do crescimento da bactéria *Klebsiella pneumoniae*.

Dessa forma, é possível observar que os óleos essenciais de orégano e tomilho apresentam ação antimicrobiana sobre as cepas de *Klebsiella pneumoniae*. E, quando incorporados em membranas de quitosana, representam uma promissora modalidade terapêutica para futuro tratamento de lesões por pressão.

7 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar a análise da composição química das membranas de quitosana incorporadas com os OEs por meio de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM);
- Analisar a citotoxicidade das membranas de quitosana incorporadas com os OEs;
- Estudar a permeabilidade a vapor d'água das membranas de quitosana incorporadas com OEs;
- Realizar o ensaio de liberação controlada dos OEs, a fim de verificar a cinética e o tempo de liberação;
- Fazer estudos pré-clínicos e posteriormente clínicos, com estudo experimental em modelo animal;

REFERÊNCIAS

- ABDULGHANI, S.; MITCHELL, G. R. Biomaterials for in situ tissue regeneration: A review. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 750, 2019.
- ABREU, R.A.; NÓBREGA, T.M.A.; LEITE, J. S. P.; QUIRINO, D.D. Protocolo de Lesão por pressão. Universidade Federal de Campina Grande- UFCG e Hospital Universitário Alcides Carneiro -HUAC. PRT.CPTLE.003 – Página 1/18, 2022.
- ABURAYAN, W. S.; BOOQ, R. Y.; BINSALEH, N. S. *et al.* The Delivery of the Novel Drug ‘Halicin’ Using Electrospun Fibers for the Treatment of Pressure Ulcer against Pathogenic Bacteria. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 12, p. 1189, 2020.
- ADAME-GALLEGOS, JR; ANDRADE-OCHOA, S.; NEVAREZ-MOORILLON, GV. Uso potencial do óleo essencial de orégano mexicano contra parasitas, fungos e patógenos bacterianos. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 19, p. 553-567, 2016.
- AGUIAR, K. R.; BATALHA, G. P.; PEIXOTO, M.; RAMOS, A.; PEZZIN, S. H. Produção de membranas híbridas zirconizadas de SPEEK/Copolissilsesquioxano para aplicação em células a combustível do tipo PEM. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.22, n.5, p.453-459, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282012005000060>
- AGUIAR, F. C.; SOLARTE, A. L.; TARRADAS, C.; GÓMEZ-GASCÓN, L.; ASTORGA, R.; MALDONADO, A.; HUERTA, B. Combined effect of conventional antimicrobials with essential oils and their main components against resistant *Streptococcus suis* strains. **Letters in applied microbiology**, v. 68, n. 6, p. 562-572, 2019.
- AGUIAR, P. P.; ARMOND, L.C.A.; PEREIRA, P.S.; GOMIDES, L.F. The risks of *Klebsiella pneumoniae* in Hospital Environments. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**. v..32, n.1, p.33-40, 2020.
- AHMAD, A.; VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. Unravelling the complex antimicrobial interactions of essential oils—the case of *Thymus vulgaris* (Thyme). **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2896-2910, 2014.
- ALBUQUERQUE, A.C.L.; PEREIRA, M.D.S.V.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, L.F.; SILVA, D.F.; MACEDO-COSTA, M.R.; HIGINO, J.S. Efeito antiaderente do extrato da *Matricaria recutita* Linn. sobre microorganismos do biofilme dental. **Rev. Odontol. UNESP**, v.39, p.21-25, 2010
- ALDERDEN, J.; RONDINELLI, J.; PEPPER, G.; CUMMINS, M.; WHITNEY, J. Risk factors for pressure injuries among critical care patients: a systematic review. **International journal of nursing studies**, v. 71, p. 97-114, 2017.
- ALIBI, S.; SELMA, W. B.; RAMOS-VIVAS, J. *et al.* Anti-oxidant, antibacterial, anti-biofilm, and anti-quorum sensing activities of four essential oils against multidrug-resistant bacterial clinical isolates. **Current Research in Translational Medicine**, v. 68, n. 2, p. 59-66, 2020.
- ALJAAFARI, M. N.; ALALI, A. O., BAQAIS, L. *et al.* An overview of the potential therapeutic applications of essential oils. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 628, 2021.

AL-MARIRI, A.; SAFI, M. In vitro antibacterial activity of several plant extracts and oils against some gram-negative bacteria. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v.39, p. 36–43,2014.

ALMEIDA, V. V. P. **Infecções por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos em hospital de nível terciário: epidemiologia e caracterização**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, 2013.

ALTERTHUM, F.; TRABULSI, L. R.; GOMPERTZ, O. F. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, p.586, 1999.

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, n. 7, p. 2227-2236, 2010.

AMARAL, R.G. Contribuição dos produtos naturais para o desenvolvimento de tratamentos para o câncer. **Biotecnologia- cadernos de graduação**. Ciências Biológicas e de Saúde, Aracaju, v. 5, n. 2, p. 119-134,2019.

ANTIĆ, J.; HOUDKOVA, M.; URBANOVA, K.; KOKOSKA, L. Antibacterial Activity of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil Vapours and Their GC/MS Analysis Using Solid-Phase Microextraction and Syringe Headspace Sampling Techniques. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6553, 2021.

ARATO, V.; RASO, M. M.; GASPERINI, G.; BERLANDA SCORZA, F.; MICOLI, F. (Prophylaxis and treatment against *Klebsiella pneumoniae*: current insights on this emerging anti-microbial resistant global threat. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 4042, 2021.

ASTM International: F1635-04 Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants,2009.

ASTM International: F2103-01 Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and TissueEngineered Medical Product Applications, 2007.

AYAZ, F.; DEMIR, D.; BOLGEN, N. Differential anti-inflammatory properties of chitosan-based cryogel scaffolds depending on chitosan/gelatin ratio. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 682-690, 2021.

BAKER, J. M.; AL-NAKKASH, L.; HERBST-KRALOVETZ, M. M. Estrogen–gut microbiome axis: Physiological and clinical implications. **Maturitas**, v. 103, p. 45-53, 2017.

BALAJI, A. B.; PAKALAPATI, H.; KHALID, M.; WALVEKAR, R.; SIDDIQUI, H. Natural and synthetic biocompatible and biodegradable polymers. Biodegradable and biocompatible polymer composites: processing, properties and applications. Woodhead Publishing series in composites science and engineering. **Duxford: Woodhead Publishing**, p. 3-32, 2017

BARBOSA, C. R. DOS S.; SCHERF, J. R.; FREITAS, T. S. *et al.* Effect of carvacrol and thymol on NorA efflux pump inhibition in multidrug-resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 53, n. 4, p. 489-498, 2021.

BARBOSA, R. C. **Compósitos quitosana/carbonato de cálcio para utilização em cânulas de fistula ruminal**. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, 119 f, 2011.

BARON, E.J.; MILLER, J.M.; WEINSTEIN, M.P. *et al.* A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). **Clinical infectious diseases**, v. 57, n. 4, p. e22-e121, 2013.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BERECHET, M. D.; GAIDAU, C.; MILETIC, A. *et al.* Bioactive properties of nanofibres based on concentrated collagen hydrolysate loaded with thyme and oregano essential oils. **Materials**, v. 13, n. 7, p. 1618, 2020.

BERNARDO, A. F. C.; SANTOS, K. dos; SILVA, D. P. da. Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade. **Revista Saúde em foco**, v. 1, n. 11, p. 1221-33, 2019.

BERNARDO, M. P.; PASCHOALIN, R. T.; SANTOS, D. M. D. *et al.* Processamento e Aplicação de Biomateriais Poliméricos: Avanços Recentes e Perspectivas. **Química Nova**, v. 44, p. 1311-1327, 2021.

BIRANJE, S. S.; MADIWALE, P. V.; PATANKAR, K. C.; CHHABRA, R.; BANGDE, P.; DANDEKAR, P.; ADIVAREKAR, R. V. Cytotoxicity and hemostatic activity of chitosan/carrageenan composite wound healing dressing for traumatic hemorrhage. **Carbohydrate polymers**, v. 239, p. 116106, 2020.

BONA, E.A.M.; PINTO, F. G. D. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. D. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n.3, p. 218-225, 2014.

BONA, J. C. **Preparação e Caracterização de Filmes Biodegradáveis a partir de Blendas de Amido com Polietileno**. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

BORA, L.; AVRAM, S.; PAVEL, I. Z. *et al.* An Up-To-Date Review Regarding Cutaneous Benefits of *Origanum vulgare* L. Essential Oil. **Antibiotics**, v. 11, n. 5, p. 549, 2022.

- CABARKAPA, I.; COLOVIC, R.; DURAGIC, O.; POPOVIC, S.; KOKIC, B.; MILANOV, D.; PEZO, L. Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella Enteritidis*. **Biofouling**, v. 35, n. 3, p. 361-375, 2019.
- CALIRI, M. H.L.; SANTOS, V. L. C. G.; MANDELBAUM, M. H. S.; COSTA, I. G. Classificação das lesões por pressão-consenso NPUAP 2016: adaptada culturalmente para o Brasil. **Assoc Bras Estomaterapia–SOBEST e da Assoc Bras Enferm em Dermatologia-SOBENDE**, 2016.
- CAO, T. L.; YANG, S.; SONG, K. B. Development of burdock root inulin/chitosan blend films containing oregano and thyme essential oils. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 131, 2018.
- CARDOSO, V. M. **O microbioma humano**. Tese de Doutorado. Universidade Fernando Pessoa Faculdade de Ciências da Saúde Porto, 2015.
- CASTRO, J. I.; VALENCIA-LLANO, C. H.; VALENCIA-ZAPATA, M. E. *et al.* Chitosan/Polyvinyl Alcohol/Tea Tree Essential Oil Composite Films for Biomedical Applications. **Polymers**, v. 13, n. 21, p. 3753, 2021.
- CEYLAN, S. Propolis loaded and genipin-crosslinked PVA/chitosan membranes; characterization properties and cytocompatibility/genotoxicity response for wound dressing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, p. 1196-1206, 2021.
- CHAIB, S.; BENALI, N.; ARHAB, R.; SADRAOUI AJMI, I.; BENDAOUED, H.; ROMDHANE, M. Preparation of *Thymus vulgaris* essential oil microcapsules by complex coacervation and direct emulsion: Synthesis, characterization and controlled release properties. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 46, p. 5429-5446, 2021.
- CHEN, C.; TUNG, H. H.; TUNG, T. H.; DENQ, J. C. Nutrition, exercise, and skin integrity among frail older adults in Taiwan. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 30, n. 8, p. 364-371, 2017.
- CHOI, M.; HASAN, N.; CAO, J.; LEE, J.; HLAING, S. P.; YOO, J. W. Chitosan-based nitric oxide-releasing dressing for anti-biofilm and in vivo healing activities in MRSA biofilm-infected wounds. **International journal of biological macromolecules**, v. 142, p. 680-692, 2020.
- CHUNG, M.; WIDDEL, M.; KIRCHHOFF, J. *et al.* Risk Factors for Pressure Injuries in Adult Patients: A Narrative Synthesis. **International journal of environmental research and public health**, v. 19, n. 2, p. 761, 2022.
- CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. **Antibiotics In Laboratory Medicine**, v. 3, p. 739-787, 1991.
- CLSI. Clinical And Laboratory Standards Institute. Approved Standards M100-S22. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests 16.ed. Approved Standard. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne. Pennsylvania USA, 2012.

COATES, R.; MORAN, J.; HORSBURGH, M. J. Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. **Future Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 75-91, 2014.

COX, J.; SCHALLOM, M. Pressure injuries in critical care patients: a conceptual schema. **Advances in skin & wound care**, v. 34, n. 3, p. 124-131, 2021.

CRUZ, J. B.; CATÃO, C. D. D. S.; BARBOSA, R. C.; FOOK, M. V. L. Síntese e caracterização de arcabouços de quitosana com agentes antineoplásicos. **Revista Matéria**, v.21, n.1, p. 129 – 140, 2016.

CUNHA, V. O. Bactérias multirresistentes: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase enzima KPC nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). 2014.

DALGLEISH, L.; CAMPBELL, J.; FINLAYSON, K.; COYER, F. Acute skin failure in the critically ill adult population: a systematic review. **Advances in skin & wound care**, v. 33, n. 2, p. 76-83, 2020.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membrana de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 212f., 2005.

DANA, A. N.; BAUMAN, W. A. Bacteriology of pressure ulcers in individuals with spinal cord injury: What we know and what we should know. **The Journal of Spinal Cord Medicine**, v. 38, n. 2, p. 147-160, 2015.

DEINEKA, V.; SULAIEVA, O.; PERNAKOV, N., et al. Hemostatic performance and biocompatibility of chitosan-based agents in experimental parenchymal bleeding. **Materials Science and Engineering: C**, v. 120, p. 111740, 2021.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.

DI MARTINO, A.; KUCHARCZYK, P.; CAPAKOVA, Z.; HUMPOLICEK, P.; SEDLARIK, V. Chitosan-based nanocomplexes for simultaneous loading, burstreduction and controlled release of doxorubicin and 5-fluorouracil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.102, p. 613–624, 2017

EDSBERG, L. E.; BLACK, J. M.; GOLDBERG, M.; MCNICHOL, L.; MOORE, L.; SIEGGREEN, M. Revised national pressure ulcer advisory panel pressure injury staging system: revised pressure injury staging system. **Journal of Wound, Ostomy, and Continence Nursing**, v. 43, n. 6, p. 585, 2016.

EGLSEER, D.; HODL, M.; LOHRMANN, C. Nutritional management of older hospitalised patients with pressure injuries. **International wound journal**, v. 16, n. 1, p. 226-232, 2019.

EULÁLIO, E.J. da C.; ALMEIDA, I.B.; GONÇALVES, C.C.; FOOK, M.V.L. **Membranas de quitosana e quercetina para aplicação em ulcerações epiteliais- Desenvolvimento e caracterização**. Aracaju: Instituto Federal de Sergipe, 2019, ISBN:978-85-9591-099-7.

FERREIRA, I. L. **Preparação e caracterização de biomateriais poliméricos para avaliação da viabilidade de uso como phantom biológico**. 2016. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Física-INFIS. Orientadora: Andrea Antunes Pereira. Uberlândia, 2016.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; VIANA, M. P. *et al.* Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 3, p. 1045-1058, 2011. doi: 10.1590/S0001-3765201100500001

FOOK, A. C. B. M. **Produção e caracterização de arcabouços compósitos ha/biopolímero para engenharia de tecidos**. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 137 f., 2012.

FOURNOMITI, M.; KIMBARIS, A.; MANTZOURANI, I. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial ecology in health and disease**, v. 26, n. 1, p. 23289, 2015.

FRATINI, F.; MANCINI, S.; TURCHI, B.; FRISCIA, E.; PISTELLI, L.; GIUSTI, G.; CERRI, D. A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* JR et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. **Microbiological research**, v. 195, p. 11-17, 2017.

FREIRE, I. L. S.; OLIVEIRA, R.; VASCONCELOS, Q. L. D.; MENEZES, L. C. C.; COSTA, I. K. F.; VASCONCELOS TORRES, G. Perfil microbiológico, de sensibilidade e resistência bacteriana das hemoculturas de unidade de terapia intensiva pediátrica. **Revista de Enfermagem da UFSM**, v. 3, n. 3, p. 429-439, 2013.

GADELHA, F.M. **Desenvolvimento de substância viscoelástica para utilização intraocular**. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2021

GALAVICOVA, L.; BOROTOVA, P.; VALKOVA, V.; VUKOVIC, N.L.; VUKIC, M.; STEFANIKOVA, J.; DURANOVA, H.D.; KOWALCZEWSKI, P.L.; CMIKOV, N.; KACANIOVA, M. *Thymus vulgaris* Essential Oil and Its Biological Activity. **Plants**, v.10, p. 1959, 2021.

GALDINO, T. P.; OLIVEIRA, L. C.; LIMA, E. P. N.; FRIAS, R.I.R.; JESUS, R.A.; QUEIROZ, S.F.A.M.; SANTOS, A.C.Q.; FOOK, M.V.L. Síntese e caracterização da O-Carboximetilquitosana como alternativa ao uso do Ácido Hialurônico. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, p. e5011527634-e5011527634, 2022.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, F. P.; SOLDEVILLA-AGREDA, J. J.; RODRIGUEZ-PALMA, M.; PANCORBO-HIDALGO, P. L. Skin injuries associated with severe life-

threatening situations: O new conceptual framework. **Journal of Nursing Scholarship**, v. 54, n. 1, p. 72-80, 2022.

GOMES, F.; FURTADO, G.E.; HENRIQUE, M.; SOUSA, L.B.; SANTOS-COSTA, P.; BERNARDES, R.; APÓSTOLO, J.; PARREIRA, J.; SALGUEIRO-OLIVEIRA, A. The skin microbiome of infected pressure ulcers: a review and implications for health professionals. **European Journal of Clinical Investigation**, v.52, n.1, p.13688, 2022.

GOMES, P. R. B.; LISTON, M. S.; SILVA, J. C. Estudo da composição química e aplicação do óleo essencial *Origanum vulgare* L como agente antibacteriano em sururu (*Mytella charruana*) in natura. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 6, 2019.

GRAY, R. J.; VOEGELI, D.; BADER, D. L. Features of lymphatic dysfunction in compressed skin tissues—implications in pressure ulcer etiology. **Journal of tissue viability**, v. 25, n. 1, p. 26-31, 2016.

GUARDA, A.; RUBILAR, J. F.; MILTZ, J.; GALOTTO, M. J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International journal of food microbiology**, v. 146, n. 2, p. 144-150, 2011.

GUERRA, F. Q. S.; MENDES, J. M.; OLIVEIRA, W.; COSTA, J.; COUTINHO, H. D. M.; LIMA, E. O. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oil on multi-drug resistant *Acinetobacter* spp. strains. **Biofar: Revista de Biologia e farmácia**, v. 8, n.1, p. 62- 70, 2012.

HABIBA, U.; LEE, J. J. L.; JOO, T. C.; ANG, B. C.; AFIFI, A. M. Degradation of methyl orange and congo red by using chitosan/polyvinyl alcohol/TiO₂ electrospun nanofibrous membrane. **International journal of biological macromolecules**, v. 131, p. 821-827, 2019.

HAFIDH, R.R.; ABDULAMIR, A.S.; VERN, L.S.; BAKAR, F.A.; ABAS, F.; JAHANSHIRI, F.; SEKAWI, Z. Inibição do crescimento de patógenos bacterianos e fúngicos altamente resistentes por um produto natural. **The open microbiology journal**, 5,96,2011

HAHNEL, E.; BLUME-PEYTAVI, U.; TROJAHN, C.; KOTTNER, J. Associations between skin barrier characteristics, skin conditions and health of aged nursing home residents: a multi-center prevalence and correlational study. **BMC geriatrics**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2017

HAN, D.; KANG, B.; KIM, J. *et al.* Prolonged stay in the emergency department is an independent risk factor for hospital acquired pressure ulcer. **International Wound Journal**, v. 17, p.259-267, 2020.

HAN, X.; PARKER, T.L. Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil in a human skin disease model. **Biochimie Open**, v.4, p. 73–77,2017.

HANNIGAN, G. D.; DUHAIME, M. B.; KOUTRA, D.; SCHLOSS, P. D. Biogeography and environmental conditions shape bacteriophage-bacteria networks across the human microbiome. **Computational Biology PLOS**, v. 14, n. 4, p. 1006099, 2018.

HARRIS, T. A.; GATTU, S.; PROPHETER, D. C. *et al.* Resistin-like molecule α provides vitamin-A-dependent antimicrobial protection in the skin. **Cell host & microbe**, v. 25, n. 6, p. 777-788. e8, 2019.

HASSAN, M. A.; TAMER, T. M.; VALACHOVÁ, K.; OMER, A. M.; EL-SHAFFEEY, M.; ELDIN, M. S. M.; SOLTÉS, L. Antioxidant and antibacterial polyelectrolyte wound dressing based on chitosan/hyaluronan/phosphatidylcholine dihydroquercetin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 18-31, 2021.

HASSAN, M. E.; HASSAN, R. R.; DIAB, K. A.; EL-NEKEETY, A. A.; HASSAN, N. S.; ABDEL-WAHHAB, M. A. Nanoencapsulation of thyme essential oil: a new avenue to enhance its protective role against oxidative stress and cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 37, p. 52046-52063, 2021.

HEMMINGSSEN, L. M.; SKALKO-BASNET, N.; JORAHOLMEN, M. W. The Expanded Role of Chitosan in Localized Antimicrobial Therapy. **Marine Drugs**, v. 19, n. 12, p. 697, 2021.

HERBÁRIO UNIRIO. Disponível em: <http://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/origanum-vulgare-l>>. Acessado em 24 de setembro de 2022

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.66, n.5, p.407-415,2014.

HU, B.; GUO, Y.; LI, H.; LIU, X.; FU, Y.; DING, F. Recent advances in chitosan-based layer-by-layer biomaterials and their biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 271, p. 118427, 2021.

ISO 10993-5:2009 (2009): Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity; German version EN ISO 10993-5:2009.

JAN, S.; RASHID, M.; ABD_ALLAH, E. F.; AHMAD, P. Biological efficacy of essential oils and plant extracts of cultivated and wild ecotypes of *Origanum vulgare* L. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

JAYASENA, DD; JO, C. Óleos essenciais como potenciais agentes antimicrobianos em carnes e produtos cárneos: Uma revisão. **Trends in Food Science & Technology**, v. 34, p. 96-108,2013.

JIANG, I.; YONG, P. J.; ALLAIRE, C.; BEDAIWY, M. A. Intricate Connections between the Microbiota and Endometriosis. **International Journal of Molecular sciences**, v. 22, n. 11, p. 5644, 2021.

JIANG, Q.; LIU, Y.; WEI, W. *et al.* The prevalence, characteristics, and related factors of pressure injury in medical staff wearing personal protective equipment against COVID-19 in China: a multicenter cross-sectional survey. **International Wound Journal**, v. 17, p.1300-1309, 2020

JIMÉNEZ-GÓMEZ, C. P.; CECILIA, J. A. Chitosan: a natural biopolymer with a wide and varied range of applications. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3981, 2020.

JOYCE, K.; FABRA, G. T.; BOZKURT, Y.; PANDIT, A. Bioactive potential of natural biomaterials: Identification, retention and assessment of biological properties. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1-28, 2021.

KOBAYASHI, T.; NAIK, S.; NAGAO, K. Choreographing immunity in the skin epithelial barrier. **Immunity**, v. 50, n. 3, p. 552-565, 2019.

KOOSHEGOL, S.; EBRAHIMIAN-HOSSEINABADI, M.; ALIZADEH, M.; ZAMANIAN, A. Preparation and characterization of in situ chitosan/polyethylene glycol fumarate/thymol hydrogel as an effective wound dressing. **Materials Science and Engineering: C**, v. 79, p. 66-75, 2017.

KOSAKOWSKA, O.; WĘGLARZ, Z.; PIÓRO-JABRUCKA, E.; PRZYBYŁ, J. L.; KRAŚNIEWSKA, K.; GNIEWOSZ, M.; BAĆZEK, K. Antioxidant and antibacterial activity of essential oils and hydroethanolic extracts of Greek oregano (*O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart) and common oregano (*O. vulgare* L. subsp. *vulgare*). **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 988, 2021

KOU, S. G.; PETERS, L.; MUCALO, M. Chitosan: A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms. **Carbohydrate Polymers**, p. 119-132, 2022.

KOZICS, K.; BUCKOVÁ, M.; PUSKÁROVÁ, A.; KALÁSZOVÁ, V.; CABICAROVÁ, T.; PANGALLO, D. The effect of ten essential oils on several cutaneous drug-resistant microorganisms and their cyto/genotoxic and antioxidant properties. **Molecules**, v. 24, n. 24, p. 4570, 2019.

KRAPP, F.; MORRIS, A. R.; OZER, E. A.; HAUSER, A. R. Virulence characteristics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains from Patients with Necrotizing Skin and Soft Tissue Infections. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

KUFFLER, D. P. Improving the ability to eliminate wounds and pressure ulcers. **Wound Repair and Regeneration**, v.23, n.3, p.312- 317,2015.

KUMAR, S.; MAITI, P. Controlled biodegradation of polymers using nanoparticles and its application. **RSC Advances**, v. 6, n. 72, p. 67449-67480, 2016.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. **Robbins Basic Pathology**; Elsevier Health Sciences: New York, NY, USA, 2013.

KUMIRSKA, J.; WEINHOLD, M. X.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Biomedical activity of chitin/chitosan-based materials—influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation. **Polymers**, v. 3, n. 4, p. 1875-1901, 2011.

KWIATKOWSKI, P.; PRUSS, A.; GRYGORCEWICZ, B. *et al.* Preliminary study on the antibacterial activity of essential oils alone and in combination with gentamicin against

extended-spectrum β -lactamase-producing and New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 9, p. 1368-1375, 2018.

LABEAU, S.O.; AFONSO, E.; BENBENISTHY, J. *et al.* Prevalence, associated factors and outcomes of pressure injuries in adult intensive care unit patients: the DecubICUs study. **Intensive Care Medicine**, n. 47, p.160–169, 2021.

LANGEMO, D.; CAMPBELL, K. E.; HOLLOWAY, S.; LEBLANC, K.; TARIQ, G.; BEECKMAN, D. Applying Frailty Syndrome to the Skin: A Review and Guide for Prevention and Management. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 34, n. 8, p. 444-447, 2021.

LEE, J.-H.; KIM, Y.-G.; LEE, J. Carvacrol-rich oregano oil and thymol-rich thyme red oil inhibit biofilm formation and the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 6, p. 1420-1428, 2017.

LEMRASKI, E. G.; JAHANGIRIAN, H.; DASHTI, M.; KHAJEHALI, E.; SHARAFINIA, S.; RAFIEE-MOGHADDAM, R.; WEBSTER, T. J. Antimicrobial double-layer wound dressing based on chitosan/polyvinyl alcohol/copper: in vitro and in vivo assessment. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 223, 2021.

LEYVA-LÓPEZ, N.; GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P.; VAZQUEZ-OLIVO, G.; HEREDIA, J. B. Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 989, 2017.

LEYVA-LÓPEZ, N.; NAIR, V.; BANG, W.Y.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; HEREDIA, J.B. Protective role of terpenes and polyphenols from three species of oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in raw 264.7 macrophage cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.187, p. 302–312,2016.

LOMBREA, A.; ANTAL, D.; ARDELEAN, F. *et al.* A recent insight regarding the phytochemistry and bioactivity of *Origanum vulgare* L. essential oil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 9653, 2020.

LOTUFO, L. V. C. **Produtos naturais como protótipos de novos fármacos para o tratamento do cancer**. 2015.Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

LU, H.; BUTLER, J. A.; BRITTEN, N. S.; VENKATRAMAN, P. D.; RAHATEKAR, S. S. Natural Antimicrobial Nano Composite Fibres Manufactured from a Combination of Alginate and Oregano Essential Oil. **Nanomaterials**, v. 11, n. 8, p. 2062, 2021.

LUCENA, B. de M. **Dispositivo tubular de quitosana para utilização como biomaterial**. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2020.

LUZ, S. R.; LOPACINSKI, A.C.; FRAGA, R.; URBAN, C.A. Úlceras de pressão. **Geriatrics & gerontologia**, v. 4, n. 1, p. 36-43, 2010.

MACIEL, B. C.; DE MATTOS, L. P. V. A Bacteria Multirresistente *Klebsiella pneumoniae* Carbapenamase (KPC). **Atas de Ciências da Saúde (ISSN 2448-3753)**, v. 1, n. 2, 2013.

MAGI, G.; MARINI, E.; FACINELLI, B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 165, 2015.

MAN, A.; SANTACROCE, L.; LACOB, R.; MARE, A.; MAN, L. Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: A comparative study. **Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 15, 2019.

MARIANO, G.G.; BERRETA, A. L. R.Z. Principais microorganismos na lesão por pressão: uma revisão literária. **Revista Científica da FHO-Fundação Hermínio Ometto** v.7, n.1,2019

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 4, 2018.

MARTINS, M da S. **Infecção em Úlceras de Pressão e o Efeito Bactericida dos Apósitos com Prata**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2010

MASOOD, N.; AHMED, R.; TARIQ, M. *et al.* Silver nanoparticle impregnated chitosan-PEG hydrogel enhances wound healing in diabetes induced rabbits. **International journal of pharmaceutics**, v. 559, p. 23-36, 2019.

MATICA, M. A.; AACHMANN, F. L.; TØNDERVIK, A.; SLETTA, H.; OSTAFE, V. Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 23, p. 5889, 2019.

MATTINGLY, A. E.; COX, K. E.; SMITH, R.; MELANDER, R. J.; ERNST, R. K.; MELANDER, C. Screening an established natural product library identifies secondary metabolites that potentiate conventional antibiotics. **ACS infectious diseases**, v. 6, n. 10, p. 2629-2640, 2020.

MILADI, H.; ZMANTAR, T.; KOUIDHI, B. *et al.* Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. **Microbial pathogenesis**, v. 112, p. 156-163, 2017.

MOHAMED, S. H.; MOHAMED, M. S. M.; KHALIL, M. S.; AZMY, M.; MABROUK, M. I. Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate biofilms in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 1, p. 84-95, 2018.

MOHSENIPOUR, Z.; HASSANSHAHIAN, M. The inhibitory effect of *Thymus vulgaris* extracts on the planktonic form and biofilm structures of six human pathogenic bacteria. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 5, n. 4, p. 309, 2015.

MONTANARI, T. **Sistema Tegumentar**. In: Montanari, Tatiana. *Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas*. 3. ed. Porto Alegre, 2016. ISBN: 978-85-915646-3-7

MORAES, G. M.; COHRS, F. M.; BATISTA, R. E. A.; GRINBAUM, R. S. Infection or colonization with resistant microorganisms: identification of predictors. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 26, p. 185-191, 2013.

MUXIKA, A.; ETXABIDE, A.; URANGA, J.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1358-1368, 2017.

NASCIMENTO, T.G.A. Importância da química de produtos naturais e sintéticos no desenvolvimento de novos medicamentos. **I Congresso Nacional de Ciências da Saúde- Avanços, Interfaces e Práticas Integrativas**, Cajazeiras, 2014.

NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African journal of biotechnology**, v. 7, n. 12, 2008.

NEGUT, I.; GRUMEZESCU, V.; GRUMEZESCU, A. M. Treatment strategies for infected wounds. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2392, 2018.

NICULESCU, A. G.; GRUMEZESCU, A. M. An up-to-date review of biomaterials application in wound management. **Polymers**, v. 14, n. 3, p. 421, 2022.

NIEMIEC, S. M.; LOUISELLE, A. E.; LIECHTY, K. W.; ZGHEIB, C. Role of microRNAs in pressure ulcer immune response, pathogenesis, and treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 64, 2020.

NIRWATI, H.; SINANJUNG, K.; FAHRUNISSA, F. *et al.* Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. In: **BMC proceedings**. BioMed Central, p. 1-8, 2019.

NORMAN, G.; DUMVILLE, J. C.; MOORE, Z. E.; TANNER, J.; CHRISTIE, J.; GOTO, S. Antibiotics and antiseptics for pressure ulcers (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, 2016.

NOWICKI, J. L.; MULLANY, D.; SPOONER, A.; NOWICKI, T. A.; MCKAY, P. M.; CORLEY, A.; FRASER, J. F. Are pressure injuries related to skin failure in critically ill patients? **Australian Critical Care**, 2017.

NPUAP/ EPUAP/ PPPIA. National Pressure Ulcer Advisory Panel (NPUAP), European Pressure Ulcer Advisory Panel (EPUAP) and Pan Pacific Pressure Injury Alliance (PPPIA). **Prevention and Treatment of Pressure Ulcers: Quick Reference Guide**. Emily Haesler (Ed.). Cambridge Media: Osborne Park, Western Australia; 2014.

OKAMOTO, S.; OGAI, K.; MUKAI, K.; SUGAMA, J. Association of skin microbiome with the onset and recurrence of pressure injury in bedridden elderly people. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, p. 1603, 2021

- OLIVEIRA, D. H.; FARIAS, A. M.; CLEFF, M. B.; MEIRELES, M. C. A.; RODRIGUES, M. R. A. Caracterização química do óleo essencial de *Origanum vulgare*: Análise da relação Timol/Carvacrol. In: **XVII Congresso de Iniciação Científica**, Pelotas, Brasil.2008
- OLIVEIRA, K. D. L.; HAACK, A. FORTES, R. C. Estado nutricional de idosos e prevalência de lesão por pressão na assistência domiciliar. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, 2017.
- OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIERA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006.
- 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 (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
- OULKHEIR, S.; AGHROUCH, M.; EL MOURABIT, F. *et al.* Antibacterial activity of essential oils extracts from cinnamon, thyme, clove and geranium against a gram negative and gram-positive pathogenic bacterium. **Journal of diseases and medicinal plants**, v. 3, n. 2-1, p. 1-5, 2017.
- 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.
- PAUL, P.; KOLESINSKA, B.; SUJKA, W. Chitosan and its derivatives-biomaterials with diverse biological activity for manifold applications. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 737-750, 2019.
- PAULA, L. M. M.; GUIMARÃES, A. S.; REIS, A. C. R. *et al.* Microbiota intestinal e câncer colorretal: uma revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 11, p.4672-4672, 2020.
- PENTEADO, A. L.; ESCHIONATO, R. A.; DE SOUZA, D. R. C.; QUEIROZ, S. D. N. Avaliação in vitro de atividade antimicrobiana de óleos essenciais contra *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2021.
- PEREZ, A. P.; PEREZ, N.; LOZANO, C. M. S. *et al.* The anti MRSA biofilm activity of *Thymus vulgaris* essential oil in nanovesicles. **Phytomedicine**, v. 57, p. 339-351, 2019.
- PINHEIRO, L. A. **Decifrando o envelhecimento da pele**. 2016. Disponível em: <http://dermatosaude.com.br/wp-content/uploads/2016/05/DECIFRANDO-O-ENVELHECIMENTO-DA-PELE-2.pdf>. Acesso em: 28/04/2022.
- PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C.K; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química nova**, v. 38, p. 957-971, 2015.

RADAELLI, M.; SILVA, B. P. D.; WEIDLICH, L.; HOEHNE, L.; FLACH, A.; COSTA, L. A. M. A. D.; ETHUR, E. M. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. **Brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 424-430, 2016.

RAJASEKHARAN, S. K.; RAMESH, S.; SATISH, A. S.; LEE, J. Antibiofilm and anti- β -lactamase activities of burdock root extract and chlorogenic acid against *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 542-551, 2017.

RAMALHO, M. A. da S., SANTOS, B.; RAMALHO, D.F. *et al.* Atividade antiaderente dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora* contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e406974245-e406974245, 2020.

RODRIGUES, A. R. M. **Produtos naturais na descoberta de fármacos**. 2018. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências da Saúde Universidade Fernando Pessoa, no Programa de Ciências Farmacêuticas. Porto, 2018.

RODRIGUEZ-GARCIA, I.; SILVA-ESPINOZA, B. A.; ORTEGA-RAMIREZ, L. A. *et al.* Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 10, p. 1717-1727, 2016.

ROSATO, A.; SBLANO, S.; SALVAGNO, L.; CAROCCI, A.; CLODOVEO, M. L.; CORBO, F.; FRACCHIOLLA, G. Anti-biofilm inhibitory synergistic effects of combinations of essential oils and antibiotics. **Antibiotics**, v. 9, n. 10, p. 637, 2020.

ROSTRO-ALANIS, M. DE J.; BÁEZ-GONZÁLEZ, J.; TORRES-ALVAREZ, C.; PARRA-SALDÍVAR, R.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, J.; CASTILLO, S. Chemical composition and biological activities of oregano essential oil and its fractions obtained by vacuum distillation. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1904, 2019.

SAKKAS, H.; GOUSIA, P.; ECONOMOU, V.; SAKKAS, V.; PETSIOS, S.; PAPADOPOULOU, C. In vitro antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates. **Journal of intercultural ethnopharmacology**, v. 5, n. 3, p. 212, 2016.

SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 429-438, 2017.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia**. 4. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2018. SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHÁFER, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. **Carbohydrate Polymers**, v.82, p. 277-283, 2010.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; VARGAS, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A.; CHÁFER, M. Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 1, p. 1-16, 2011.

SANTANA, M. T. P.; GOMES, L. L.; DOS SANTOS, T. A. *et al.* Atividade antibacteriana do óleo essencial da Lavandula Híbrida Grosso associada à gentamicina contra cepas de *Staphylococcus aureus*. **Archives of Health Investigation**, v. 9, n. 4, 2020.

SANTOS, D. F. DOS. Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial / Daniella Fabíola dos Santos. – 2006.

SANTOS, G.G.; MARINHO, S. M. O. C.; MIGUEL, F. B. Polímeros como biomateriais para o tecido cartilaginoso. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 3, p. 367-373, 2013.

SANTOS, E.P. dos. **Membranas de quitosana/ bioativos naturais com atividade antimicrobiana para tratamento de lesões cutâneas**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba- CT, João Pessoa, 2018.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SATYAL, P.; MURRAY, B. L.; MCFEETERS, R. L.; SETZER, W. N. Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. **Foods**, v. 5, n. 4, p. 70, 2016.

SEIBERT, G.; HORNER, R.; MENEGHETTI, B. H.; RIGHI, R. A.; FORNO, N. L. F. D.; SALLA, A. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em um hospital escola. **Einstein (São Paulo)**, v. 12, p. 282-286, 2014.

SEOW, Y. X.; YEO, C. R.; CHUNG, H. L.; YUK, H. G. Plant essential oils as active antimicrobial agents. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, n. 5, p. 625-644, 2014.

SHANMUGASUNDARAM, N.; RAVIKUMAR, T. BABU, M. Comparative physicochemical and in vitro properties of fibrillated collagen scaffolds from different sources. **Journal of biomaterials applications**. v. 18, p. 247–264, 2004.

SHEN, Z.; KAMDEN, D. P. Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. **International journal of biological macromolecules**, v. 74, p. 289-296, 2015.

SHI, C.; DUMVILLE, J.C.; CULLUM, N.; RHODES, S.; MCINNES, E. Foam surfaces for preventing pressure ulcers. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, 2021.

SHI, C.; WANG, C.; LIU, H.; LI, Q.; LI, R.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; SHAO, Y.; WANG, J. Selection of appropriate wound dressing for various wounds. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 182, 2020.

SHIBATA, K.; OGAI, K.; OGURA, K. *et al.* Skin Physiology and its Microbiome as Factors Associated with the Recurrence of Pressure Injuries. **Biological Research for Nursing**, v. 23, n. 1, p. 75- 81, 2021.

SHLOSMAN, K.; REIN, D. M.; SHEMESH, R.; KOIFMAN, N. A.; CASPI, A.; COHEN, Y. Encapsulation of Thymol and Eugenol Essential Oils Using Unmodified Cellulose: Preparation and Characterization. **Polymers**, v. 15, n. 1, p. 95, 2023.

SILVA, S. B. T.; ANDRADE, A. F.; DE FIGUEIREDO, B. Q. *et al.* Reconstrução cirúrgica por biomateriais: uma revisão integrativa de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e03101220139-e03101220139, 2021.

SILVEIRA, Z. DE S.; MACÊDO, N. S.; SAMPAIO DOS SANTOS, J. F. *et al.* Evaluation of the antibacterial activity and efflux pump reversal of thymol and carvacrol against *Staphylococcus aureus* and their toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2103, 2020.

SOBCZYK, A. DE E.; LUCHESE, C. L.; FACCIN, D. J. L.; TESSARO, I. C. Influence of replacing oregano essential oil by ground oregano leaves on chitosan/alginate-based dressings properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, p. 51-59, 2021.

SOUSA, W. J. B., **Desenvolvimento de Filmes Híbridos de quitosana/Fosfato de Cálcio com Incorporação de Vitamina E**. 2012, 100f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Programa de Pós Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG. 2012.

SOUZA, E. R. L.; CRUZ, J.H.A.; FERREIRA, J.L.S.; OLIVEIRA, H.M.B.F.; OLIVEIRA-FILHO, A.A. Potencial antimicrobiano e antiaderente do óleo essencial de *Lavandula* híbrida grosso contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*. **Archives of Health Investigation** v.10, n.6, p. 906-912, 2021.

STANESCU, P. O.; RADU, I. C.; LEU ALEXA, R. *et al.* Novel chitosan and bacterial cellulose biocomposites tailored with polymeric nanoparticles for modern wound dressing development. **Drug Delivery**, v. 28, n. 1, p. 1932-1950, 2021.

STOICA, A. E.; CHIRCOV, C.; GRUMEZESCU, A. M. Nanomaterials for wound dressings: An up-to-date overview. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2699, 2020.

SULTANKULOV, B.; BERILLO, D.; SULTANKULOVA, K.; TOKAY, T.; SAPAROV, A. Progress in the development of chitosan-based biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, p. 470, 2019.

TAGLIARI, E. **Efeito do uso de probióticos via oral na cicatrização de feridas excisionais cutâneas em ratos**. 2019 Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, C. *et al.* Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 11, p. 2707-2714, 2013.

TOMAZ, A.F. **Desenvolvimento de membrana de quitosana/ 1,4 naftoquinona para liberação controlada: curativo para feridas oncológicas**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2017.

TRIVELLA, D. B. B.; BRUDER, M. C. P.; OLIVEIRA, F. C. B. *et al.* Descoberta de fármacos a partir de produtos naturais a abordagem Molecular Power House (MPH). 2020.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. **Applied Environmental Microbiology**, 68, 1561, 2002.

UZAIR, B.; NIAZ, N.; BANO, A. *et al.* Essential oils showing in vitro anti MRSA and synergistic activity with penicillin group of antibiotics. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, 2017.

VALENCIA, C.; VALENCIA, C. H.; ZULUAGA, F.; VALENCIA, M. E.; MINA, J. H.; GRANDE-TOVAR, C. D. Synthesis and application of scaffolds of chitosan-graphene oxide by the freeze-drying method for tissue regeneration. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2651, 2018.

VAN DAMME, N.; VAN HECKE, A.; REMUE, E. *et al.* Physiological processes of inflammation and edema initiated by sustained mechanical loading in subcutaneous tissues: A scoping review. **Wound Repair and Regeneration**, v. 28, n. 2, p. 242-265, 2020.

VARGAS, M.; ALBORS, A.; CHIRALT, A. *et al.* Characterization of chitosan–oleic acid composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 2, p. 536-547, 2009.

VÁZQUEZ-UCHA, J. C.; MARTÍNEZ-GUTIÁN, M.; LASARTE-MONTEERRUBIO, C. *et al.* *Syzygium aromaticum* (clove) and *Thymus zygis* (thyme) essential oils increase susceptibility to colistin in the nosocomial pathogens *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, p. 110606, 2020.

VIGANI, B.; ROSSI, S.; SANDRI, G.; BONFERONI, M. C.; CARAMELLA, C. M.; FERRARI, F. Hyaluronic acid and chitosan-based nanosystems: A new dressing generation for wound care. **Expert opinion on drug delivery**, v. 16, n. 7, p. 715-740, 2019.

VLAIA, L.; OLARIU, I.; MUT, A. M. *et al.* New, Biocompatible, Chitosan-Gelled Microemulsions Based on Essential Oils and Sucrose Esters as Nanocarriers for Topical Delivery of Fluconazole. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 1, p. 75, 2021.

VOLLMER, D. L.; WEST, V. A.; LEPHART, E. D. Enhancing skin health: By oral administration of natural compounds and minerals with implications to the dermal microbiome. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, p. 3059, 2018.

VOUGA, M.; GREUB, G. Emerging bacterial pathogens: the past and beyond. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 1, p. 12-21, 2016.

WANG, M.; MA, L.; LI, D.; JIANG, P.; GAO, C. Preparation of polycaprolactone microspheres-aggregated scaffold with ultra big pores and fuzzy sphere surface by a one-step

phase separation method. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101, n. 11, p. 3219-3227, 2013.

WELLER, C.; TEAM, V. Interactive dressings and their role in moist wound management. In: **Advanced textiles for wound care**. Woodhead Publishing, p. 105-134, 2019.

WERT, L. A.; RENSEN, S. S.; SOONS, Z.; POEZE, M.; BOUVY, N. D.; PENDERS, J. The cutaneous microbiome in hospitalized patients with pressure ulcers. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

WESTBY, M. J.; DUMVILLE, J. C.; SOARES, M. O.; STUBBS, N.; NORMAN, G. Dressings and topical agents for treating pressure ulcers. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 6, 2017.

WU, Y.; VANDER SCHAFT, D. W.; BAAIJENS, F. P.; OOMENS, C. W. Cell death induced by mechanical compression on engineered muscle results from a gradual physiological mechanism. **Journal of biomechanics**, v. 49, n. 7, p. 1071-1077, 2016.

XIAO, S.; CUI, P.; SHI, W.; ZHANG, Y. Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2020.

XIE, H.; CHEN, X.; SHEN, X. *et al.* Preparation of chitosan-collagen-alginate composite dressing and its promoting effects on wound healing. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 93-104, 2017.

YONCHEVA, K.; BENBASSAT, N.; ZAHARIEVA, M. M. *et al.* Improvement of the antimicrobial activity of oregano oil by encapsulation in chitosan—Alginate nanoparticles. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 7017, 2021

ZENGIN, H.; BAYSAL, A. H. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17773-17798, 2014.

ZHANG, M. X.; ZHAO, W. Y.; FANG, Q. Q.; WANG, X. F.; CHEN, C. Y.; SHI, B. H.; ZHENG, B.; WANG, S.J.; TAN, W.Q.; WU, L. H. Effects of chitosan-collagen dressing on wound healing in vitro and in vivo assays. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, v. 19, 2021.

ZHOU, P.; XIA, Z.; QI, C.; HE, M.; YU, T.; SHI, L. *et al.* Construction of chitosan/Ag nanocomposite sponges and their properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, p. 272-277, 2021.

APÊNDICE

APÊNDICE A. PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA POR EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE



Fonte: Adaptada de Cruz *et al.* (2016).

ANEXO

ANEXO A. ARTIGO PUBLICADO



ISSN 1519-6984 (Print)
ISSN 1678-4375 (Online)

Original Article

Evaluation of the antimicrobial effect of the *Origanum vulgare* L essential oil on strains of *Klebsiella pneumoniae*

Avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae*

S. L. Silva^{a*}, F. S. M. Araújo^b, P. O. A. Silva^b, E. V. A. Silva^b, M. M. S. L. Bezerra^b, A. F. Diniz^c,
D. M. Oliveira^d, H. O. Jesus^d, B. B. Nascimento-Junior^d, L. A. D. M. Medeiros^b and A. A. Oliveira-Filho^a

^aUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos – PPGDITM, João Pessoa, PB, Brasil

^bUniversidade Federal de Campina Grande – UFCG, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Departamento de Odontologia, Patos, PB, Brasil

^cUniversidade Federal de Campina Grande–UFCG, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal, Patos, PB, Brasil

^dUniversidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Programa de Pós-graduação em Química – PGQUIM, Jequié, BA, Brasil

Abstract

Bacteria may be the initial cause of certain pathologies as well as a secondary agent responsible for the development of complications such as pressure ulcer infections. Pressure ulcers are a persistent health problem, especially in immunocompromised patients, and associated with infection by opportunistic microorganisms with antimicrobial resistance, such as *Klebsiella pneumoniae*, highlight the need for the development of new antimicrobial approaches. Thus, the aim of this study was to evaluate the antibacterial and anti-adherent activity of *Origanum vulgare* L. (oregano) essential oil against *Klebsiella pneumoniae* strains, as well as the effect of its association with synthetic antimicrobials. To this end, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) analyses were performed on microdilution plates. The assay of the Minimum Inhibitory Adherence Concentration (MIAC), with test tubes. As well as, the association study through the infusion disc method containing ampicillin (AMP), gentamicin (GEN), ciprofloxacin (CIP) and ceftriaxone (CEF). Therefore, it was possible to obtain that the essential oil of oregano presents antimicrobial and bactericidal activity, with MIC ranging between 128 µg/mL and 256 µg/mL and MBC between 256 µg/mL and 512 µg/mL, on the tested *K. pneumoniae* strains.