



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – DOUTORADO

MARIA GABRIELLA SILVA ARAUJO

Estudo do potencial uso de creme à base do alcaloide Berberina para feridas cutâneas

MACEIÓ

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – DOUTORADO

MARIA GABRIELLA SILVA ARAUJO

Estudo do potencial uso de creme à base do alcaloide Berberina para feridas cutâneas

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, ponto focal Alagoas da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia em Saúde.

Orientador(a): Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior

MACEIÓ

2021

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Livia Silva dos Santos – CRB-4 – 1670

A658e Araújo, Maria Gabriella Silva .

Estudo do potencial uso de creme à base do alcalóide berberina para feridas cutâneas / Maria Gabriella Silva Araújo. – 2021.
83 f.:il.

Orientador: João Xavier de Araújo Júnior.

Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 70-83

1. Feridas - Tratamento. 2. Lesões cutâneas. 3. Alcaloide barberina – Creme – Feridas. 4. Cicatrização – Feridas. 5. Antibacterianos. I. Título.

CDU: 616-001.4

MARIA GABRIELLA SILVA ARAUJO

Estudo do potencial uso de creme à base do alcaloide Berberina para feridas cutâneas.

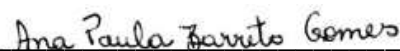
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 30/08/2021.

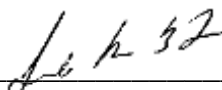
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
Orientador - Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Profa. Dra. Ana Paula Barreto Gomes
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN



Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Profa. Dra. Karol Fireman de Farias
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Dedico esta tese,

Aos meus pais, Maria Eliete e Neilton José,
Que me ensinaram a viver e se fazem presente em toda minha caminhada.

Ao meu sobrinho, Carlos Allef
Por ter nutrido minha vida com mais amor e confiança com sua chegada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado o milagre da vida e por sempre se fazer presente nela, mesmo quando me fiz ausente.

A todos os meus familiares por toda contribuição na minha formação pessoal e acadêmica.

À minha grande amiga Regina e companheira de tantos dias de lutas e de glórias, por todo apoio, carinho, amizade e paciência. Por sempre acreditar em mim, me fortalecer e sempre me dizer: você pode tudo, assim queira.

Ao meu orientador, professor Dr^o. João Xavier por aceitar me orientar e dar todos os importantes direcionamentos ao longo desses 4 anos de doutoramento e por ser um grande incentivador em orientar e formar Enfermeiras Doutoradas.

A todos os colaboradores do Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas – LpTF, minha segunda casa desde o 3^o período de graduação, onde me encantei pela pesquisa e decidi traçar esse caminho.

A todos os colaboradores do Laboratório de Pesquisa Stricto Sensu Professora Enaura Quixabeira Rosa e Silva localizando no Centro Universitário CESMAC que foram fundamentais na conclusão desta pesquisa.

Aos professores Dr^o Edeildo Ferreira e Dr^o Luciano Grillo por todas as contribuições realizadas no exame de qualificação de tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio financeiro durante o período de doutoramento.

Ao Programa de Pós-Graduação Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, em especial a Coordenadora professora Dr^a Marília Goulart e a secretária Ana Paula por

todo apoio, disposição e ajuda de sempre, bem como, todos os professores que cruzaram meu caminho de doutoranda e me transferiram ensinamentos importantes para minha vida profissional.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

Lesões cutâneas representam uma interrupção na integridade da pele que podem seguir um processo de cicatrização adequado ou entrar em um período de inflamação persistente. O tratamento de feridas tem representado um desafio para os profissionais de saúde, diante da necessidade de novas estratégias terapêuticas que garantam o curso normal do processo de cicatrização e um resultado curativo para o indivíduo acometido. O objetivo da pesquisa foi desenvolver e realizar o controle de qualidade de creme à base do alcaloide Berberina para tratamento cicatrizante de feridas. Trata-se de um estudo experimental que testou a substância em ensaios antimicrobiano in vitro pelo método de microdiluição em caldo frente a bactérias Gram positivas e negativas, teste de viabilidade celular in vitro pelo método colorimétrico de redução do Metiltetrazolium com macrófagos de linhagem J774, atividade anti-inflamatória para analisar o efeito da substância sobre síntese de Óxido Nítrico e produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e PGE-2 em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- γ , além de desenvolver uma formulação tópica com realização de ensaios de estabilidade preliminar e acelerada. Quanto a viabilidade celular, o alcaloide apresentou proliferação de macrófagos nas concentrações de 125 μ g/ml, com um percentual acima de 118,93 %. Para a atividade antibacteriana, o alcaloide exibiu concentrações inibitória mínimas de: 125 μ g/ml para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia cloacae*, 250 μ g/ml diante de *Escherichia coli* e 62,5 μ g/ml para *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella flexneri*. Quanto ao ensaio anti-inflamatório, a berberina conseguiu reduzir os níveis de nitritos em 95,20% na concentração de 500 μ g/mL; ao reduzir pela metade essa concentração (250 μ g/mL), o percentual aumentou para 95,40% e com a menor concentração (125 μ g/mL) do alcaloide utilizado, foi observado a redução de 93,16% dos níveis de nitritos dos macrófagos tratados. Ao avaliar a produção de TNF α pelos macrófagos ativados por LPS+IFN- γ , verificou-se que as 3 concentrações de berberina promoveram uma diminuição que variou de 44,29% - 49,13% com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) ao comparar com o controle negativo. Quanto a produção de IL-1 β , a berberina reduziu de forma significativa os níveis de IL-1 β ($p < 0,001$) quando comparadas ao controle negativo e controle positivo. A redução variou de 18,18% - 27,27%, exibindo percentuais menores que o do controle positivo para as 3 concentrações testadas. Quanto a produção de PGE-2, a berberina apresentou uma redução que variou de 40,44% - 43,57%, valores estes que não apresentaram diferença significativa em comparação a redução com o tratamento feito por dexametasona (50,45%) ($p > 0,05$). Quanto a atividade antiglicante, no período de 48 horas, a berberina apresentou um percentual de inibição maior que variou de 87,29% - 90,04%. No período de 72 horas, a berberina apresentou uma variação de 84,97% - 89,06% nas concentrações de 125 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml e 2000 μ g/ml, respectivamente e no período de 96 horas, a inibição de glicação pela berberina variou de 75,85% - 78,07%. A formulação desenvolvida apresentou estabilidade de formulação nos ensaios preliminares e acelerados. A produção de uma cobertura, capaz de inibir a glicação de produtos avançados, reduzir os níveis de citocinas responsáveis por reações inflamatórias que prolongam o processo de cicatrização e promove a proliferação de células que contribuem para o reparo tegumentar surge como uma alternativa positiva para melhorar a condição clínica de pessoas acometidas por lesões crônicas.

Palavras chaves: Cicatrização. Antibacterianos. Toxicidade. Berberina. Agente Anti-Inflamatório.

ABSTRACT

Skin lesions represent an interruption in the integrity of the skin that can either follow an adequate healing process or enter a period of persistent inflammation. The treatment of wounds has represented a challenge for health professionals, given the need for new therapeutic strategies that guarantee the normal course of the healing process and a curative result for the affected individual. The objective of the research was to develop and carry out the quality control of a cream based on the alkaloid Berberine for wound healing treatment. This is an experimental study that tested the substance in in vitro antimicrobial assays using the microdilution method in broth against Gram positive and negative bacteria, in vitro cell viability test using the colorimetric method of reduction of Methyltetrazolium with macrophages of the J774 lineage, activity anti-inflammatory to analyze the effect of the substance on Nitric Oxide synthesis and production of the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and PGE-2 in cultured RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS and IFN- γ , in addition to developing a topical formulation with preliminary and accelerated stability tests. As for cell viability, the isolate showed macrophage proliferation at concentrations of 125 μ g/ml, with a percentage above 118.93%. For antibacterial activity, the isolate exhibited minimal inhibitory concentrations of: 125 μ g/ml for *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia cloacae*, 250 μ g/ml against *Escherichia coli* and 62.5 μ g/ml for *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri*. As for the anti-inflammatory assay, berberine managed to reduce nitrite levels by 95.20% at a concentration of 500 μ g/mL; by halving this concentration (250 μ g/mL), the percentage increased to 95.40% and with the lowest concentration (125 μ g/mL) of the alkaloid used, a 93.16% reduction in nitrite levels of treated macrophages was observed. When evaluating the production of TNF α by macrophages activated by LPS+IFN- γ , it was found that the 3 concentrations of berberine promoted a decrease ranging from 44.29% - 49.13% with a statistically significant difference ($p < 0.001$) to compare with the negative control. As for the production of IL-1 β , berberine significantly reduced the levels of IL-1 β ($p < 0.001$) when compared to negative control and positive control. The reduction ranged from 18.18% - 27.27%, exhibiting lower percentages than the positive control for the 3 concentrations tested. As for the production of PGE-2, berberine showed a reduction ranging from 40.44% - 43.57%, values that did not show a significant difference compared to the reduction with the treatment made with dexamethasone (50.45%) ($p > 0.05$). As for the antiglycerin activity, within 48 hours, berberine presented a higher percentage of inhibition ranging from 87.29% - 90.04%. In the 72-hour period, berberine presented a variation of 84.97% - 89.06% in the concentrations of 125 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml and 2000 μ g/ml, respectively, and in the 96-hour period, the inhibition of glycation by berberine ranged from 75.85% - 78.07%. The developed formulation showed formulation stability in preliminary and accelerated tests. The production of a coating capable of inhibiting the glycation of advanced products, reducing the levels of cytokines responsible for inflammatory reactions that prolong the healing process and promote the proliferation of cells that contribute to integumentary repair emerges as a positive alternative to improve skin clinical condition of people affected by chronic injuries.

Keywords: Healing. Antibacterials. Toxicity. Berberine. Anti-Inflammatory Agents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo normal de cicatrização de feridas	14
Figura 2 - Fatores de crescimento que atuam na cicatrização de lesões de pele (BENNETT et al. 2003).....	16
Figura 3 - Principais citocinas envolvidas na cicatrização de feridas de pele. Tabela modificada de HARDING; STECHMILLER; SCHULTZ (2016).....	17
Figura 4 - Principais metaloproteinases envolvidas na cicatrização de lesões de pele (MARTINS; CALEY; O'TOOLE 2013).....	18
Figura 5 - Espécie vegetal Argemone mexicana L.....	24
Figura 6 – Quadro de atividades biológicas determinadas por estudos anteriores da espécie Argemone mexicana Linn.....	26
Figura 7 - Estrutura química do alcaloide isoquinolona Berberina.....	27
Figura 8- Fluxograma sobre os processos metodológicos realizados no estudo.....	30
Figura 10 - Ensaio de Microdiluição em caldo para determinar a atividade antibacteriana da berberina.....	33
Figura 11 - Figura 6 - Microplaca de 96 poços e concentrações para teste de microdiluição em caldo.....	35
Figura 12 - Avaliação da atividade anti-inflamatória in vitro da Berberina.....	38
Figura 13 - Desenvolvimento e controle de formulação tópica à base do alcaloide berberina.....	42
Figura 14 - Citotoxicidade da berberina frente à linhagem de macrófagos J774.....	45
Figura 15 - Efeito da berberina sobre a produção de nitrito em macrófagos RAW 264.7 estimulados por IFN- γ (50 UI/mL) e LPS (100 ug/mL).....	50
Figura 16 - Efeito da berberina sobre a produção de IL-1 β em macrófagos RAW 264.7 estimulados por IFN- γ (50 UI/mL) e LPS (100 ug/mL).....	51
Figura 17 - Efeito da berberina sobre a produção de IL-1 β em macrófagos RAW 264.7 estimulados por IFN- γ (50 UI/mL) e LPS (100 ug/mL).....	52
Figura 18 - Efeito da berberina sobre a produção de PGE2 em macrófagos RAW 264.7 estimulados por IFN- γ (50 UI/mL) e LPS (100 ug/mL).....	53
Figura 19 - Inibição da formação de AGEs formados de glicose-BSA pela berberina nas concentrações de 1000 μ g/ml, 500 μ g/ml, 125 μ g/ml pelo período de 48, 96, 72 e 120 horas.....	55

Figura 20 - Formulação tópica em creme à base de berberina para cicatrização de feridas cutâneas.	57
Figura 21 - Espalhabilidade da formulação tópica no início e fim do ciclo gela-desgela.	59
Figura 22 -Formulação submetida à radiação luminosa.....	60
Figura 23 – Ensaio de espalhabilidade da formulação tópica em comparação a formulação comercialmente vendida em diferentes condições de acondicionamento avaliado com 24 horas, 15 e 30 dias.....	63
Figura 24 - Viscosidade do creme à base de berberina em função da velocidade de rotação em comparação a cobertura Kollagenase ®	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) da berberina frente à 6 estirpes bacterianas.	47
Tabela 2 - Determinação do pH e densidade, no início e término do ciclo gela-desgela.	58
Tabela 3- pH da formulação submetido a diferentes condições de acondicionamento..	61
Tabela 4 - Densidade da formulação tópica em diferentes condições de acondicionamento.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	Advanced glycation end products
AMH	Agar Mueller Hinton
ATCC	<i>American Type Cell Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	Albumina sérica bovina
BaSO ₄	Sulfato de Bário
°C	Graus Celsius
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cl ₅₀	Concentração letal capaz de matar 50% da população
CMH	Caldo Mueller-Hinton
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 β	Interleucina-1 β
g	Gramas
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
LPS	Lipopolissacarídeo
NO	Óxido nítrico
μ g	Microgramas
μ M	Micromol
mg/mL	Miligrama por mililitro
mm	Milímetro
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
MeOH	Metanol
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGE-2	Prostaglandinas tipo-2
pg	Picograma
pH	Potencial Hidrogeniônico
RMN	Ressonância Magnética
SST	Solução Salina Tamponada
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
UFC	Unidade Formadora de Colônia

UV

$\mu\text{g}/\text{mL}$

μM

Ultravioleta

Micrograma por mililitro

Micromol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Processo de Cicatrização	13
2.2 Fatores que interferem no processo de cicatrização	19
2.3 Tratamento de Feridas	21
2.4 O uso de plantas medicinais no tratamento de feridas.....	23
2.4.1 Argemone mexicana L.	24
2.5.1.1 Berberina	27
3 OBJETIVO	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Tipo de estudo.....	30
4.2 Local do estudo	31
4.3 Substância isolada da espécie <i>Argemone mexicana</i> L.	31
4.4 Ensaio de viabilidade celular	31
4.5 Teste de atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	33
4.5.1 Solubilização da amostra.....	34
4.5.2 Preparo dos inóculos	34
4.5.3 Microdiluição em caldo.....	35
4.6 Avaliação de atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	38
4.6.1 Método ELISA para dosagem de IL-1 β , TNF- α e PGE2.....	39
4.7 Determinação de atividade antiglicante <i>in vitro</i>	40
4.8 Desenvolvimento e controle de qualidade da formulação tópica	41
4.8.1 Formulação do produto	41
4.8.2 Teste de estabilidade preliminar.....	43

4.8.3 Ensaio de estabilidade acelerada	43
4.9 Análise estatística	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Ensaio de viabilidade celular	45
5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	47
5.3 Avaliação de atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	49
5.4 Avaliação da atividade antiglicante	54
5.5 Formulação e ensaios de estabilidade da formulação	57
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	66
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

A pele exerce função protetora para o organismo contra fatores ambientais. Quando há uma interrupção em sua integridade ocorre o aparecimento de lesões cutâneas que podem apresentar um processo de cicatrização adequado ou entrar em um período de inflamação persistente.

A cicatrização de feridas é um sistema dinâmico com fases interligadas que podem ser influenciadas por fatores externos e internos, os quais podem alterar o estado de saúde geral do seu portador.

O cuidado e tratamento de feridas tem se tornado um desafio para o profissional de saúde, que sempre deve estar em busca de novas estratégias para garantir o curso normal do processo de cicatrização e um resultado curativo para o indivíduo acometido desta lesão.

O desenvolvimento de bioprodutos que tenham a finalidade de regenerar a pele é de grande interesse científico e clínico, visto que esses produtos são utilizados como curativos ou segunda coberturas em lesões e para isso necessitam que sua estrutura favoreça o transporte de gases e nutrientes. Além de exercer função de proteção mecânica, os curativos devem atuar como barreiras contra infecções bacterianas e perda de fluídos e proteínas, como também, estimular a migração e proliferação celular e formação de novo tecido.

Neste sentido, encontra-se com forte tendência mundial a utilização de recursos naturais para o tratamento de feridas, onde os metabólitos secundários encontrados em espécies vegetais tornam-se uma alternativa promissora para o tratamento de enfermidades dermatológicas, com destaque para as lesões cutâneas com processo de cicatrização retardado.

A atividade biológica da espécie vegetal *Argemone mexicana* Linn e de seus constituintes químicos isolados foi avaliada em alguns estudos que tiveram a finalidade de determinar diferentes atividades dessa espécie vegetal, dentre as quais estão: antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória, antialérgica, antistress, vasoconstritor e vasorelaxante, antioxidante, antidiabética, antitumoral (BRAHMACHARI; GORAI; ROY, 2013).

Este estudo foi norteado por dissertação de mestrado já realizada pela pesquisadora principal e que apresentou resultados promissores para atividade cicatrizante com um alcaloide isolado da espécie vegetal em questão (Araujo, 2017).

Trata-se de uma pesquisa relevante por se tratar de uma investigação aplicada que poderá proporcionar mudanças significativas nas práticas de saúde, haja vista a inovação tecnológica à base de produtos naturais que se mostram promissoras no tratamento de feridas.

Considerando as pesquisas já existentes sobre as atividades farmacológicas e biológicas desta espécie vegetal, este estudo se propôs a desenvolver uma formulação tópica para cicatrização de lesões cutânea à base do alcaloide Berberina, um alcaloide sintético derivado da espécie vegetal *Argemone mexicana* L.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Processo de Cicatrização

A pele é o maior órgão humano e imprescindível para a vida, a qual representa 15% do peso corpóreo. Tem a função de isolar os componentes orgânicos do ambiente externo e sua complexa estrutura de tecidos é capaz de exercer diferentes funções como termorregulação, proteção e percepção (SILVA et. al. 2007).

Este órgão está suscetível a agressões procedentes de patologias intrínsecas ou extrínsecas que irão provocar alterações na sua constituição, como acontece no surgimento de lesões cutâneas (MORAIS; OLIVEIRA; SOARES, 2008).

As feridas cutâneas são resultados de um rompimento da integridade da pele (LAUREANO; RODRIGUES, 2011). É uma lesão corporal física, a qual pode atingir as estruturas cutâneas superficiais e as estruturas subjacentes da pele (HUSSEIN et. al. 2011).

Toda lesão tissular é iniciada através de uma alteração estrutural ou molecular nas células, que se encontravam em estado de equilíbrio homeostático com capacidade de lidar com as demandas fisiológicas. Dependendo do estímulo patológico as células podem se adaptar a situação e manterem preservadas sua viabilidade celular, mas quando esses estímulos excedem a capacidade de adaptação, uma sequência de eventos é iniciada e resulta na lesão (SILVA et. al. 2007).

Com a ruptura da pele, o processo de cicatrização é logo iniciado, o qual compreende uma sequência de eventos moleculares complexos que envolve a organização de células, sinais químicos e matriz extracelular objetivando a restauração do tecido lesado (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

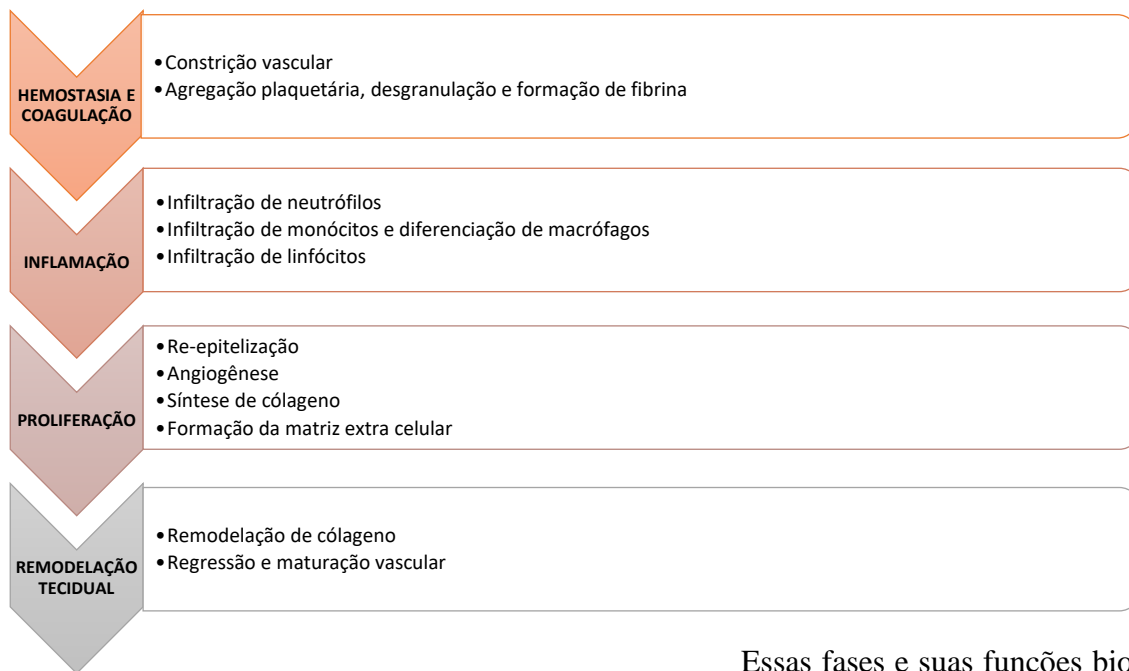
O processo de cicatrização envolve uma complexa integração em cascata, o qual requer a presença de múltiplas citocinas e fatores de crescimento para as diferentes funções de estimulação e inibição que se iniciam nas diferentes fases que resultam na cicatrização da ferida (BARSOTTI et. al. 2013).

Este processo varia de acordo com o comprometimento tecidual, que classifica a lesão como ferida de espessura parcial e ferida de espessura total (SILVA et al., 2007). Em uma ferida de espessura parcial, o processo de cicatrização é iniciado com o preenchimento de sangue na lesão, formação de crosta com restos celulares desvitalizados e partículas de tecido. Em seguida, a camada epitelial é incorporada por células epiteliais que se separaram da membrana basal, migraram em direção à área lesionada e proliferaram-se por mitose. Quando

a cicatrização é concluída, a crosta se desprende resultando em uma cicatriz frequentemente imperceptível (SILVA et. al. 2007).

O processo de cicatrização de uma ferida de espessura total é mais complexo e de longa duração quando comparado à cicatrização de feridas de espessura parcial. Ele consiste em 4 fases altamente integradas, que são: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação tissular (figura 1) (GOSAIN; DIPIETRO, 2004).

Figura 1 - Processo normal de cicatrização de feridas



Essas fases e suas funções biológicas ocorrem de forma sequenciada, num tempo intrínseco, dependente da intensidade da lesão. Interrupções em alguma das fases ou prolongamento do processo pode provocar o retardamento da cicatrização ou tornar a ferida crônica (GUO; DIPIETRO, 2010).

Imediatamente após a lesão, a fase da hemostasia e coagulação é iniciada, a fim de evitar a exsanguinação. Devido ao reflexo neuronal, os vasos se contraem rapidamente provocando os eventos hemostáticos na lesão, juntamente a eles a cascata de coagulação é iniciada causando a agregação plaquetária, formação de coágulos e compostos de fibrina ao entrar em contato com o colágeno exposto (VELNAR; BAILEY; SMRKOL, 2009).

Em seguida, a fase inflamatória é iniciada com o objetivo de criar uma barreira imune contra microrganismos invasores. Trata-se de uma resposta local não específica a danos nos tecidos e/ou invasão bacteriana, sendo um importante mecanismo de defesa do organismo e essencial para o processo de cura (DEALEY, 2005).

Durante essa fase ocorre à vasodilatação com extravasamento de líquido plasmático contendo tampões de fibrina que bloqueiam o fluxo linfático e “fecham” a ferida localizando a inflamação e inibindo a disseminação de infecção (SILVA et. al. 2007). Simultaneamente a vasodilatação, acontece a migração de leucócitos ao longo do endotélio vascular, infiltração de neutrófilos, monócitos e macrófagos para realização da fagocitose (CAMPOS et al., 2008).

Após a “limpeza” da ferida pelos leucócitos durante a fase inflamatória, inicia-se a fase proliferativa caracterizada pela proliferação epitelial e migração através da matriz provisória na ferida denominada de re-epitelização. Os fibroblastos e os reparadores endoteliais são as células mais importantes durante esse período, pois proporcionam o crescimento capilar, a formação do colágeno e do tecido de granulação, após alta proliferação e síntese da matriz extracelular a ferida entra na fase de remodelação final (VELNAR; BAILEY; SMRKOL, 2009).

Durante a fase de remodelação, a ferida torna-se menos vascularizada, as fibras de colágeno são reorganizadas de forma linear às margens da ferida. Há uma constante e coordenada degradação e síntese de colágeno, onde o tecido cicatricial é remodelado e se torna comparável ao tecido normal após um longo período (DEALEY, 2005).

Todos os mecanismos envolvidos no processo de cicatrização dependem da exposição do tecido a fatores sistêmicos e locais como idade, imobilidade, estado nutricional, doenças associadas, uso contínuo de medicamentos, localização anatômica da ferida, presença de infecção e tecido desvitalizado podem interferir no processo de cicatrização da pele e retardar sua recuperação, representando um desafio clínico a ser superado (PAUL; SHARMA, 2004).

Os elementos locais e sistêmicos conseguem atuar de forma independente em uma ou mais fase do processo de cicatrização, bem como são capazes de agir em conjunto interferindo na dinâmica da cicatrização.

Os fatores locais ou endógenos influenciam diretamente as características da própria ferida, enquanto os fatores sistêmicos estão relacionados à saúde ou à doença do estado geral do indivíduo que afetam a sua capacidade de cura (GUO; DIPIETRO, 2010), representados pela quantidade de exsudato que pode ocasionar a presença de maceração ou dessecação da lesão, equilíbrio bacteriano anormal ou instalação de infecção na área, presença de corpos estranhos e exacerbamento da reação inflamatório por meio dos mecanismos moleculares e celulares, baixo fornecimento vascular para a lesão, bem como traumas repetidos (KHALIL, et al., 2015).

Os fatores endógenos influenciam os mecanismos moleculares e celulares para a correta mediação da cicatrização (FIGURA 2). Dentre os fatores endógenos, apenas alguns dos fatores de crescimento e citocinas que mediam a cicatrização na pele já foram identificados. Os fatores de crescimento como: o FGF, PDGF, EGF e TGF- β 1 são liberados no local da lesão e considerados de grande relevância para a cicatrização cutânea (SUN et al., 2013).

Figura 2 - Fatores de crescimento que atuam na cicatrização de lesões de pele (BENNETT et al. 2003).

Fator de Crescimento	Mecanismo envolvido	Célula secretora	Influência na cicatrização
PDGF	Inflamação, síntese e remodelamento de matriz extracelular	Plaquetas, macrófagos	Atração de neutrófilos e fibroblastos/ Proliferação de células endoteliais e fibroblastos
FGF-2	Síntese e remodelamento de matriz extracelular	Fibroblastos, células endoteliais	Proliferação de fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos
KGF	Reepitelização	Fibroblastos	Proliferação e migração de queratinócitos
EGF	Reepitelização	Queratinócitos e macrófagos	Proliferação de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais
TGF- β 1	Inflamação, síntese e remodelamento de matriz extracelular	Plaquetas, macrófagos, fibroblastos, neutrófilos e queratinócitos	Estímulo da angiogênese e síntese de matriz extracelular/ Proliferação e diferenciação de fibroblastos
VEGF	Síntese de matriz extracelular	Neutrófilos, plaquetas, células endoteliais	Estímulo da angiogênese

O TGF- β 1 está envolvido em quase todos os estágios da cicatrização na pele, amplificando a migração de células inflamatórias para o local da lesão, estimulando a angiogênese, a formação do tecido de granulação e a re-epitelização, além de aumentar a deposição de colágeno III na fase proliferativa e a força tensora do tecido através da deposição de colágeno I (CAIADO et al., 2011; ROSENSTEEL et al., 2010). Sendo assim, tem sido demonstrado que a cicatrização acelerada de feridas cutâneas está relacionada ao aumento da expressão de TGF- β 1 (ATIBA et al., 2011; GANESHKUMAR et al., 2012).

O EGF sintetizado pelas plaquetas, macrófagos, fibroblastos e queratinócitos tem efeito parácrino sobre a migração dos queratinócitos. A expressão de EGF é maior durante a fase de re-epitelização e contração da ferida, estimulando o recobrimento da superfície lesada e a formação do tecido de granulação (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). A síntese de VEGF

pelos macrófagos, células endoteliais e fibroblastos é crucial para a angiogênese, sendo que falhas nesse processo retardariam a cicatrização (OBERRINGER et al., 2008).

Os mediadores inflamatórios (figura 3) também são fatores cruciais para a cicatrização e reconstrução do tecido, uma vez que células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos são importantes para a remoção do tecido morto e evitar a disseminação de um processo infeccioso para outras regiões do corpo, além das funções reguladoras das citocinas inflamatórias na sequência do mecanismo cicatricial (DOVI; HE; DIPIETRO, 2003; MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004).

Figura 3 - Principais citocinas envolvidas na cicatrização de feridas de pele. Tabela modificada de HARDING; STECHMILLER; SCHULTZ (2016).

Citocinas pró-inflamatórias	Célula secretora	Efeito biológico
TNF- α	Macrófagos	Citotoxicidade de PMNs/ Síntese de MMPs
IL-1 β	Macrófagos, queratinócitos	Quimiotaxia de fibroblastos e queratinócitos/ Síntese de MMPs
IL-6	Macrófagos, queratinócitos, PMNs	Proliferação de fibroblastos
IL-8	Macrófagos, fibroblastos	Quimiotaxia de macrófagos e PMNs/ Síntese de colágeno
IL- γ	Macrófagos, linfócitos T	Ativação de macrófagos e PMNs/ Diminuição de colágeno/ Síntese de MMPs
Citocinas anti-inflamatórias		
IL-4	Linfócitos T, basófilos, mastócitos	Redução de TNF- α , IL-1 e IL-6/ Proliferação de fibroblastos/ Síntese de colágeno
IL-10	Linfócitos T, macrófagos, queratinócitos	Redução de TNF- α , IL-1 e IL-6/ Inibe ativação de macrófagos e PMNs

PMNs: células polimorfonucleares MMPs: metaloproteinases de matriz extracelular

Entretanto, o desequilíbrio entre mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios poderá determinar o atraso do processo cicatricial e a consequente formação de feridas crônicas que dificultam a qualidade de vida dos pacientes (MORIN et al., 2012). Sendo assim, a compreensão da ação das citocinas no processo de cicatrização na pele pode levar a novas e efetivas estratégias terapêuticas (ALZOGHAIBI et al., 2014).

As metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs – matrix metalloproteinases) (figura 4) constituem uma família de enzimas responsáveis pela degradação de vários componentes da matriz extracelular, como por exemplo, a membrana basal, colágeno intersticial, matrilisinas, fibronectina e várias proteoglicanas (VOELKEL; TUDER, 2000). A atividade excessiva ou desequilibrada das MMPs tem sido associada ao desenvolvimento inicial da ferida, bem como nas fases de angiogênese, epitelização e remodelação da cicatriz. O padrão de atuação MMPs no processo de cicatrização de feridas é complexo e sua atividade varia de acordo com a fase do processo de cicatrização (ARMSTRONG; JUDE, 2002). Um efetivo processo cicatricial também envolve adequada biossíntese, deposição e subsequente maturação do colágeno, componente essencial e principal da matriz extracelular. Os 15 níveis do colágeno tipo III são maiores na fase proliferativa, quando ele será sintetizado. O colágeno tipo III tem função de agregação plaquetária e é importante na formação da rede hemostática. Na fase seguinte (de remodelamento), o colágeno III é substituído por colágeno I (MAEHATA et al., 2007), sendo que o sucesso do remodelamento do colágeno é fator determinante para a força tensora das regiões cicatrizadas (HAIFEI et al., 2014).

Figura 4 - Principais metaloproteinases envolvidas na cicatrização de lesões de pele (MARTINS; CALEY; O'TOOLE 2013).

Classe de MMP	Substrato	Influência no processo de cicatrização
MMP-1	Colágenos I, II, III, VII e X; macroglobulina- α 2; calicreína; quimase	Remodelamento de matriz extracelular/ Auxilia na migração de queratinócitos/ Superexpressão em queratinócitos causa atraso na reepitelização
MMP-8	Colágenos I, II e III; macroglobulina- α 2	Remodelamento de matriz extracelular
MMP-13	Colágenos I, II, III, IV, IX, X e XIV; fibronectina	Auxilia na retração da lesão
MMP-2	Colágenos I, III, IV, V, VII e	Migração de queratinócitos

	X; laminina; agrecan; fibronectina	(reepitelização)/ Migração de fibroblastos e células endoteliais pela matriz extracelular
MMP-9	Colágenos I, III, IV, V e VII; elastina; agrecan; fibrilina	Migração celular e reepitelização (exceto na córnea)

2.2 Fatores que interferem no processo de cicatrização

Tendo em vista os eventos que envolvem a cicatrização de feridas de pele, observa-se a existência de vários fatores que podem comprometer a cicatrização de feridas quando são capazes de agir em uma ou mais fases deste processo.

As condições sistêmicas são mais difíceis de serem controladas e compreendem características que interferem no indivíduo de forma ampla. Alguns dos fatores sistêmicos são idade, gênero, a mobilidade, cânceres, nutrição, stress, doenças crônicas e deficiência no fornecimento de sangue venoso e arterial para a lesão (BRYANT & DENISE, 2012).

Dentre os fatores que estão relacionados ao retardamento do processo de cicatrização de uma ferida cutânea está a presença de microrganismos patogênicos, que causam danos a toda extensão do tecido atingindo a estética e funcionalidade da região lesionada (CAMPOS et al., 2016)

A infecção de uma ferida cutânea acontece devido à presença e proliferação dos microrganismos na região lesionada que contribui para a cronificação da lesão (SCHULTZ et. al. 2011). O sistema imune natural não consegue conter os microrganismos que invadem e disseminam-se em tecidos viáveis provocando uma série de respostas locais e sistêmicas (AAWC, 2008).

Sabe-se que a inflamação é uma etapa esperada durante a cicatrização da ferida e importante para a remoção de microrganismos contaminantes. No entanto, quando não há uma descontaminação eficaz da lesão, as bactérias e as endotoxinas podem proporcionar o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) e o TNF- α , responsáveis por prolongar a fase inflamatória, além de aumentar os níveis de metaloproteases de matriz

(MMPs), que podem degradar a MEC direcionando a lesão a um estado crônico e dificultando a cura da lesão (EDWARDS, HARDING; 2004; MENKE, WARD, WITTEN, 2007)

. Nas feridas infectadas, as bactérias se apresentam em forma de biofilmes, considerado como comunidades complexas de bactérias agregadas e envolvidas em uma matriz de polissacarídeo extracelular (EPS). Os biofilmes são mais resistentes ao tratamento com antibióticos convencionais, visto que protegem as bactérias da fagocitose de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) (WATTERS et al., 2013).

O retardamento no processo de cicatrização por meio do surgimento de infecção na lesão causa interferências de ordem física, psicológica, social e econômica para seu portador e sociedade que o circunda, como também, agravos com consequências que podem ser incompatíveis com a vida do paciente (BORGES et. al. 2008).

Outro fator sistêmico que dificulta o processo de cicatrização é quando o indivíduo possui o diagnóstico de diabetes mellitus, condição caracterizada pelo aumento nos níveis de glicose (hiperglicemia) e uma perda relativa ou total da ação de insulina (GIACCO; BROWNLEE, 2010), o que conduz o indivíduo a complicações de longo prazo.

Com a hiperglicemia ocorre uma elevada captação de glicose pelas células que ocasiona um aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que na via glicolítica a alta produção de EROs contribui para diminuição da atividade da enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), a qual atua na quebra de glicose para obter energia e moléculas de carbono. Com a atividade da enzima GAPDH reduzida há uma contribuição para a formação de produtos irreversíveis de glicação avançada (AGEs) (BROWNLEE, 2001).

No diabetes mellitus, a hiperglicemia no líquido intersticial e sangue pode induzir a glicação de várias proteínas estruturais, incluindo proteínas plasmáticas como a albumina e o fibrinogênio e proteínas da MEC como o colágeno (KHAN et al. 2009). A glicação avançada é a principal via envolvida no desenvolvimento e progressão das diferentes complicações que acometem os pacientes diagnosticados com DM (SINGH et al., 2014).

As complicações vasculares do diabetes mellitus são a principal causa de morbimortalidade nos países desenvolvidos e constituem preocupação crescente para as autoridades de saúde em todo o mundo (ZIMMET, ALBERTI, SHAW, 2001). O processo de cicatrização no indivíduo com diabetes mellitus é alterado, com a lesão há um retardo no fluxo das células inflamatórias, mas com o estabelecimento dessas células no local da ferida, um estado de inflamação crônica é provocado, o que impede a deposição de componentes da

matriz extracelular, remodelamento e cura da lesão por meio do seu fechamento completo (BARBOSA, OLIVEIRA, SEARA, 2008).

No estado de inflamação crônica há interação AGEs-RAGE, que liberam moléculas pró-inflamatórias, como o TNF- α e as metaloproteinases (MMPs), responsáveis pela destruição da MEC, dificultando o fechamento da lesão. Além disso, há uma interação nos fibroblastos que pode provocar a redução da adequada deposição de colágeno, dificultando ainda mais o curso normal da cicatrização (Ahmed, 2005).

Desta forma, é perceptível o valor dos AGEs na origem e evolução das complicações do diabetes e por isso representam alvo promissor para o desenvolvimento de tratamentos tópicos adequados (BARBOSA, OLIVEIRA, SEARA, 2008).

2.3 Tratamento de Feridas

Considerando a complexidade dos eventos celulares e moleculares que acontecem no processo de cicatrização, a escolha pelo tratamento tópico deve ser de acordo com as características da lesão, visto que o processo de cicatrização é dinâmico (DABIRI., DAMSTETTER, PHILLIPS; 2016).

Os profissionais de saúde enfrentam grandes dificuldades em encontrar o melhor tratamento que seja eficaz na cicatrização de feridas crônicas, principalmente aquelas que entraram num estado de cronicidade devido a instalação de uma infecção ou em consequência do Diabetes Mellitus que causa a lesão de pé diabético (ALVES et. al. 2008).

Desde 1960, a teoria de proporcionar um ambiente úmido é ideal para alcançar a cura das feridas crônicas, por isso muitos tratamentos foram desenvolvidos para maximizar a quantidade de umidade e dessa forma, proporcionar um ambiente ideal para a lesão. Escolher um curativo adequado é de grande importância para a cicatrização de feridas crônicas (FALANGA et al., 2012).

A infecção de uma ferida cutânea acontece devido à presença e proliferação dos microrganismos na região lesionada que contribui para a cronificação da lesão. O sistema imune natural não consegue conter os microrganismos que invadem e disseminam-se em tecidos viáveis provocando uma série de respostas locais e sistêmicas (SCHULTZ et. al. 2011).

O maior efeito negativo da presença de infecção em uma ferida é o retardamento da síntese de colágeno e o estímulo para sua degradação. Além disso, a infecção prolonga a fase

inflamatória e impede a epitelização, como também, a presença de microrganismos na lesão causa alterações no metabolismo das células envolvidas na cicatrização, pois competem entre si para obtenção de oxigênio e nutrientes (SILVA et. al. 2007).

Neste mesmo sentido, encontram-se as lesões de pé diabéticos, que representam a principal causa de hospitalização e aumentam o risco de amputação em pacientes diabéticos em mais de dez vezes, exigindo dos profissionais e instituições de saúde um tratamento rápido e efetivo, visto que o atraso no tratamento à ferida pode causar graves consequências como amputação e até o óbito (SAMPAIO, CARVALHO, CARNEIRO, 2018).

Os custos dos tratamentos relacionados ao retardamento do processo de cicatrização, como a presença de infecção na ferida ou lesões de pé diabéticos, aumentam a importância dos estudos em busca de medicamentos e curativos capazes de interagir com o tecido lesado acelerando seu reparo (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Ao considerar os mediadores e mecanismos presentes no processo de cicatrização, os fármacos escolhidos para o tratamento das lesões cutâneas podem apresentar atividades: anti-inflamatória, antimicrobianos, provocar o desbridamento do tecido lesado, influenciar a re-epitelização ou remodelar a matriz extracelular (RENNERT et al., 2013).

No entanto, alguns tratamentos utilizados podem não ser eficazes dependendo do local e tipo de lesão, por isso pesquisadores e indústrias buscam de forma constante explorar novas alternativas terapêuticas que sejam eficazes e de baixo custo para uso no tratamento de feridas cutâneas (CETIN et al., 2013).

Os produtos tópicos utilizados para o tratamento de lesões cutâneas, também chamados de coberturas, atuam protegendo a ferida com a finalidade de favorecer o processo de cicatrização e de proteger a lesão contra agressões externas. As coberturas são classificadas de acordo com o desempenho: podem ser passivas (proteção e cobertura da ferida); hidroativas ou interativas (microambiente úmido) e bioativas (elementos que estimulam a cura da lesão) e quanto ao contato com o leito da ferida, classificadas em: coberturas primárias (colocadas diretamente sobre as feridas) e secundárias (sobre coberturas primárias) (BORGES et al., 2008).

Estima-se que cerca de 4 milhões de brasileiros sejam portadoras de lesões crônicas ou apresentem algum tipo de deficiência no processo de cicatrização, estatística que pressiona os profissionais e serviços de saúde pela busca de novos conhecimento, capacidade de ofertar uma assistência adequada e investimento em pesquisas que desenvolvam novas coberturas

com menor custo, maior eficácia e mais acessível para a população brasileira (MANDELBAUM, DI SANTIS E MANDELBAUM, 2013).

Neste contexto, as coberturas com formulações em creme apresentam melhor adesão pelos pacientes e profissionais por apresentarem facilidade de espalhabilidade, ser menos gorduroso e capaz de promover um alívio ao tecido inflamado (AULTON, 2005).

Os cremes são formulações semissólidas constituídos por substâncias medicamentosas dissolvidos em suas fases aquosa ou oleosa. Apresentam-se como um dos principais veículos para desenvolvimento de formulações para uso tópico por exibirem diversas vantagens, como: afinidade com o revestimento cutâneo, possibilidade de incorporação simultânea substâncias de naturezas diferentes (hidrofílica e lipofílica), apresentar diferentes texturas, consistência e adequada capacidade de penetração (FERREIRA, 2002).

2.4 O uso de plantas medicinais no tratamento de feridas

Desde os primórdios, o homem tenta encontrar métodos para obter melhores resultados no tratamento de doenças. Nesta busca, as plantas medicinais tiveram um lugar de destaque, as quais foram utilizadas para fins medicinais constituindo a base terapêutica da prática médica (BRANCO-NETO et al. 2006).

O uso de plantas medicinais como tratamento para a saúde humana é uma prática milenar, que foi formada por meio da sabedoria do senso comum associada aos aspectos culturais e de saúde presentes em um determinado contexto histórico (ALVIM et. al. 2008).

Durante séculos, as plantas medicinais, vêm sendo estudadas como alternativas para o tratamento de diversas enfermidades dermatológicas, tendo destaque em lesões cutâneas que apresentam processos cicatriciais de complexa resolução (PARENTE et al., 2009).

Mesmo com o desenvolvimento dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais permanecem como forma alternativa de tratamento de feridas em várias partes do mundo, isso acontece porque muitos pacientes portadores de feridas continuam com os hábitos populares, por crença ou pela dificuldade de acesso aos medicamentos sintéticos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2009).

Desta forma, nos últimos anos têm-se observado o reconhecimento das ervas medicinais como tratamento alternativo ou complementar. Diversos fitoterápicos que já foram testados e usados no processo de cicatrização de feridas cutâneas se mostraram promissores (GARROS et. al., 2006).

Quando comparadas às drogas sintéticas, as plantas medicinais utilizadas no tratamento de lesões cutâneas apresentam vantagens, como: menores chances de apresentar efeitos colaterais e reações adversas intensas, baixos custos e abundância da espécie vegetal utilizada. Como também, permitem um maior acesso e valorização das preparações à base de plantas que tem crescido nas duas últimas décadas (ALVIM et al, 2008).

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do planeta, são, aproximadamente, 120.000 espécies vegetais, entretanto, somente 10% destas espécies foram estudadas do ponto de vista químico e biológico. Com isso, constata-se a grande importância de pesquisas que visam descobrir as diversas atividades medicinais destas espécies (BASTOS, 2012).

2.4.1 Argemone mexicana L.

A família Papaveraceae, usualmente conhecida como a família de papoula possui grande importância etnofarmacológica. É representada por 44 gêneros e cerca de 760 espécies de plantas com flores, dentre elas está a *Argemone mexicana* Linn usada em diversos lugares do mundo, para o tratamento de várias doenças (BRAHMACHAR; GORAI, 2013).

A *Argemone mexicana* Linn (Figura 2), conhecida como Ghamoya e pertencente a Classe Magnoliopsida é uma erva daninha encontrada na América central, mas com grande distribuição em diversos países tropicais e sub-tropicais, incluindo África Ocidental (IBRAHIM; IBRAHIM, 2009).

Figura 5 - Espécie vegetal *Argemone mexicana* L.



Fonte: Dados da pesquisa, 2021, Maceió – AL.

Trata-se de uma erva anual espinhoso medindo, aproximadamente, 1 m de altura; suas folhas medem, geralmente, de 5 a 11 cm de comprimento com uma tonalidade que mescla entre o verde e o branco (CHOPRA et. al. 1956). As flores possuem um diâmetro que varia de 4 a 5 cm de cor amarela e sem cheiro com uma cápsula espinhosa, ovalada ou elíptico-oblongo, com cerca de 3 cm de comprimento e sementes esféricas de cor escura (BRAHMACHARI; GORAI; ROY, 2013).

É usualmente conhecida como “papoula espinhosa mexicana”, “cardo santo” ou “chicalote”. Diferentes partes da planta são usadas em doenças crônicas de pele, e como emético, expectorante, emoliente e diurético. As sementes e o óleo de semente são utilizados como um remédio para a disenteria, úlceras, asma e outras afecções intestinais (SAVITHRAMMA et. al. 2007).

No México, seu uso acontece para tratar a catarata, infecção da pele, dor em geral e inflamação, enquanto na Índia é usada no tratamento de hidropisia, icterícia, oftalmia, sarna e afecções cutâneas. Na Índia, o suco amarelo extraído da planta é bastante usado contra hidropisia, icterícia, oftalmia, sarna e afecções cutâneas (SHARMA et. al. 2012).

No Brasil, é habitualmente conhecida como “cardo-santo” e é usada de forma tradicional no combate de inúmeras doenças (AGRA et. al. 2008; BIESKI et. al. 2012). Sua infusão é aplicada contra hipertensão (BIESKI et. al. 2012) e suas sementes são usadas para efeitos laxativos, enquanto seu látex é usado contra a conjuntivite (AGRA et. al. 2008).

A espécie vegetal *Argemone mexicana* Linn apresenta diversos compostos secundários de grande importância biológica em toda sua estrutura. Compostos como alcaloides, esteroides livres, cumarinas, antronas (ARAUJO et. al 2015), flavonoides, fenois, saponinas, taninos, glicosídeos (JOSHI et. al 2013) têm sido encontrados em diferentes partes da espécie vegetal em questão.

Quatro alcaloides foram isolados e identificados pela primeira vez na espécie *Argemone mexicana* Linn, os quais são: alcaloides isoquinolona, Dehydrocorydalmina, Jatrorrhizina, Columbamina, Oxyberberina (SINGH et al. 2010a).

Um novo alcaloide benzilisoquinoleínico, argemexirine foi identificado por provas espectral e química, juntamente com outros dois alcaloides protoberberina conhecidos por dl-tetrahydrocoptisine e dihydrocoptisine (SINGH et al. 2010b).

Em estudo que avaliou a atividade antitumoral da espécie foram isolados 6 alcaloides a partir do extrato metanólico da planta, que foram: 13-oxoprotopine, protomexicine, 8-methoxydihydrosanguinarine, dehydrocorydalmine, jatrorrhizine, 8-oxyberberina (SINGH et al. 2016).

Nas sementes desta espécie vegetal foram encontrados e determinadas as estruturas moleculares dos alcaloides Allocryptopine, Berberina, Chelerythrina, Copsitina, Dihydrosanguinarina, Protopina, Sanguinarina (GOBATO et al. 2015).

O alcaloide protomexicine e uma nova isoflavonoide, denominada de mexitin, juntamente com 8-methoxydihydrosanguinarine, 13-oxoprotopine, rutina e quercetina foram isolados das partes aéreas desta espécie e identificadas por meio de dados espectrais (SINGH; PANDEY; SINGH, 2012).

Três alcaloides quaternários foram isolados, identificados por meio da cromatografia de alta eficiência e denominados de tânico, cafeico e ácidos ferúlico, os quais demonstraram ter atividade antifúngica, sendo capazes de inibir a germinação de esporos (SINGH et al. 2010c).

O flavonoide Tricin, a flavona 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxy flavanone-4'- α -L-rhamnopyranosyl-7-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-galactopyranoside e o flavonona Chrysoeriol foram isolados a partir da fração metanólica de sementes da espécie vegetal em questão (YADAVA; SHARMA; YADAV, 2014).

As atividades biológicas de extratos brutos e constituintes químicos isolados dessa espécie vegetal foram realizados em diversos estudos, conforme apresentado na figura 6.

Figura 6 – Quadro de atividades biológicas determinadas por estudos anteriores da espécie *Argemone mexicana* Linn.

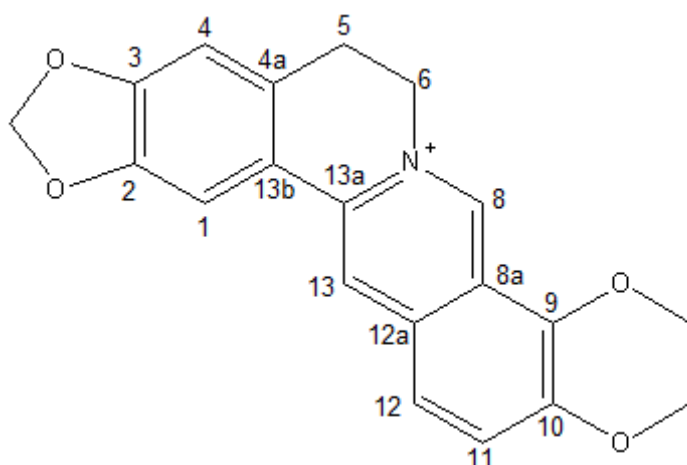
Atividade biológica	Referências
Antibacteriano	Saranya et al., 2012; Rahman et al., 2009; Singh et al, 2009; Jain et al., 2012; Pandey & Karanwal, 2011; Rosas-Pinom et al., 2012; Araujo et al. 2014a; Araujo et al. 2015b
Antitumoral	Chang et al., 2003; Gacche et al., 2011; GALI et al., 2011
Anti-inflamatória	Sharma et al., 2010; Sukumar. et ai, 1984
Cicatrizante	Ghosh et al., 2005; Jain & Patil, 2011; Dash & Murthy, 2011; Kumari; Pattanaik; Thakur, 2015
Anti-helmíntica	Jaliwala et al., 2011; Majeed et al., 2011
	Sakthivadivel & Thilagavathy, 2003; Willcox et al., 2007; Sakthivadivel et al.,

Larvicida	2012
Antioxidante	Bhardwaj et al., 2011
Antidiabética	Nayak et al., 2011; ROUT et al., 2011
Antihepatotóxica	Sourabie et al., 2012; Das et al., 2009

2.5.1.1 Berberina

Em estudo que antecede a presente pesquisa (Araujo, 2017), foi isolado da espécie vegetal *Argemone mexicana* L., um alcaloide identificado e caracterizado como berberina (Figura 7).

Figura 7 - Estrutura química do alcaloide isoquinolona Berberina.



Os alcaloides são metabólitos secundários presentes em cerca de 20 % das espécies vegetais. Trata-se de moléculas nitrogenadas com baixo peso molecular com uma extensa variedade de estruturas químicas e de atividades biológicas (KROYMANN, 2011).

A berberina é um alcaloide quartenário isoquinolona que pode ser isolado de várias espécies vegetais, como: *Hydrastis canadensis*, *Berberis aristata*, *Chinensis coptis*, *Coptis rizoma*, *Coptis japonica*, *Phellondendron amurense*, *Phellondendron chinense* Schneid (IMANSHAHIDI & HOSSEINZADEH, 2008) e dentre elas inclui-se a *Argemone mexicana* Linn. Trata-se de um metabólito secundário que por sua estrutura apresenta uma grande diversidade de propriedades terapêuticas (SAMAL, 2013).

Este metabólito tem se tornado evidente para atuação como agente terapêutico contra diversas patologias, como: hiperlipidemia, diabetes, síndrome metabólica, síndrome do ovário

policístico, obesidade, esteatose hepática e doença da artéria coronária (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001).

As propriedades farmacológicas exibidas por este alcaloide indicam que possui um potencial para amplo espectro de aplicações clínicas. Sua estrutura apresenta um esqueleto biologicamente relevante que condicionada a modificações químicas adequadas podem direcionar de forma seletiva suas atividades farmacológicas (TILLHON et al., 2012), no entanto, estas modificações devem garantir de forma segura o uso desta substância para que seja livre de toxicidade.

Em Araujo (2017), foi realizado um ensaio pré-clínico de cicatrização, onde foram produzidas feridas limpas no dorso dos ratos da espécie *Ratus norvegicus albinus* para serem tratadas com um gel à base de berberina isolado de folhas da espécie vegetal *Argemone mexicana* L., o qual apresentou melhor atividade cicatrizante, com maior contração da área da ferida e formação de novos tecidos; além de apresentar menores escores de sinais de inflamação durante o processo de cicatrização.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Estudar o potencial uso do creme à base de berberina para feridas cutâneas.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as seguintes atividades biológica da berberina:
 - Atividade antimicrobiana da berberina frente às principais bactérias causadoras de infecção em feridas;
 - Viabilidade celular;
 - Ação antiglicante
 - Analisar o efeito sobre a síntese de Óxido Nítrico em macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ ;
 - Investigar o efeito sobre a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e PGE-2 em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- γ ;
- Desenvolver creme com incorporação da berberina
- Realizar testes de estabilidade preliminar e acelerada do bioproduto desenvolvido.

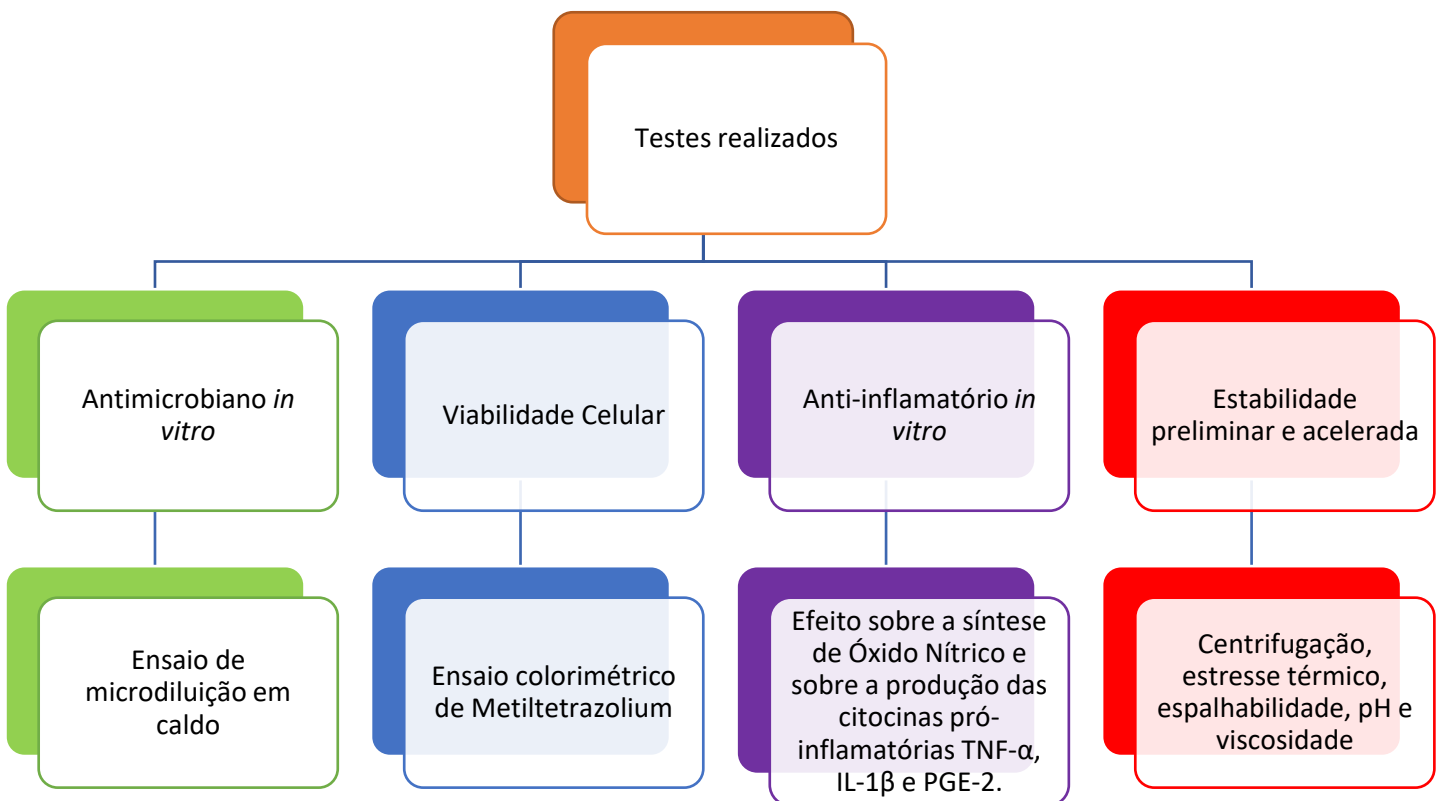
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental de desenvolvimento de formulação tópica com incorporação do alcaloide berberina para cicatrização de feridas cutâneas.

O estudo foi composto por testes antimicrobiano *in vitro* por meio do método de microdiluição em caldo com determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, realização do teste de viabilidade celular *in vitro* pelo ensaio colorimétrico de Metiltetrazolium, teste de inibição da formação de produtos de glicação avançada, atividades anti-inflamatória por meio do efeito sobre a síntese de Óxido Nítrico e investigar o efeito sobre a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e PGE-2 em macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ . Além disso, foi constituído por ensaios que avaliaram a estabilidade e controle de qualidade da formulação desenvolvida, com testes: de centrifugação, viscosidade, estresse térmico, espalhabilidade e pH (FIGURA 1).

Figura 8- Fluxograma sobre os processos metodológicos realizados no estudo.



4.2 Local do estudo

O estudo ocorreu nos laboratórios abaixo relacionados:

O teste de viabilidade celular foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), coordenado pelo professor Dr. Emiliano Barreto.

Os testes antimicrobianos in vitro e antiglicante foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas da Escola de Enfermagem - UFAL, coordenado pela Prof.^a Dr.^a Patrícia de Albuquerque Sarmiento.

4.3 Substância isolada da espécie *Argemone mexicana* L.

Em Araujo (2017) foi realizado o isolamento e identificação do alcaloide berberina da fração metanólica de folhas da espécie vegetal *Argemone mexicana* L. Considerando os resultados obtidos no estudo anterior e identificando que trata-se de uma substância já conhecida e comercialmente vendida e mediante a necessidade de desenvolvimento de bioproduto em quantidade para testes de estabilidade, optou por adquirir a berberina na farmácia de manipulação Ao Farmacêutico, localizada na cidade de Maceió, Alagoas.

Para os ensaios in vitro foi utilizada a substância isolada de folhas da espécie *Argemone mexicana* Linn e para o desenvolvimento do creme foi utilizada a berberina sintética.

4.4 Ensaio de viabilidade celular

Para a avaliação da citotoxicidade da berberina foi realizado o método colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT), baseado na atividade mitocondrial das células pela redução do MTT, através da clivagem do sal de tetrazólio, de coloração amarelada, em cristais de formazan, de coloração azul escuro, pela enzima succinato desidrogenase, presente nas mitocôndrias ativas. Quanto mais escura a coloração ao final da reação, maior é a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Macrófagos da linhagem J774 foram colocados em placas de 96 cavidades com uma densidade de 2×10^5 células por poço cultivados em meio Dulbecco Mem (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, onde cada cavidade recebeu 200 μ L do meio com as células.

As células foram tratadas com o alcaloide nas concentrações de 1000, 500, 250, 125 µg/mL por 48 h e mantidas em estufa a 5 % de CO₂. No período de 1 hora antes de adicionar o Metiltetrazolium (MTT), três poços foram lisados com 2 µL de Triton 100X para comparação de morte celular.

Os poços controles consistiram de células mortas como controle positivo (células lisadas – 3 poços) e células cultivadas acrescidas do diluente DMSO como controle negativo.

Após o período de incubação total, o sobrenadante foi descartado e em cada cavidade foi adicionado 100 µL de uma solução de MTT (500 µg/mL) e reincubadas por 1 hora em estufa a 37° C e a 5 % de CO₂. Após esse período o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensionado com 100 µL de DMSO.

Para a quantificação do sal de formazan reduzido, as placas serão lidas com o auxílio de um leitor de microplacas no comprimento de onda 550 nm. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade celular e o estado metabólico da célula a partir da redução do sal de tetrazólio (coloração amarela) a formazan (coloração azul escuro) (MOSMANN, 1983).

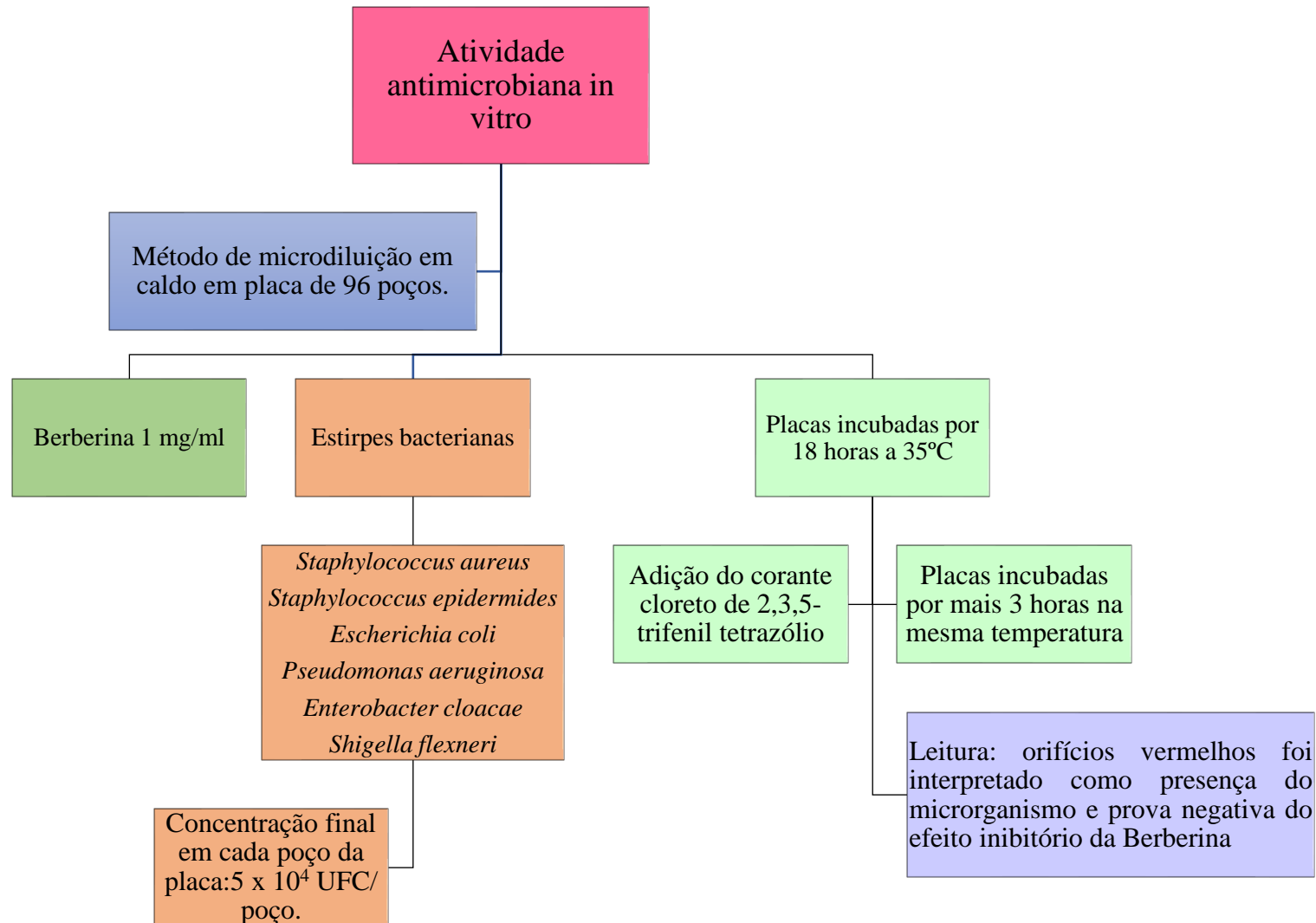
Os dados foram expressos como média das absorbâncias ± SEM e diferenças estatísticas entre os grupos tratados e os de controle foram avaliadas por ANOVA e teste de Dunnett, onde os níveis de significância em comparação com grupos de controle foram identificados por asterisco (p < 0,05). O percentual de viabilidade celular foi calculado de acordo com a absorbância do controle positivo e do alcaloide, utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \textit{Viabilidade} = 100 \times \frac{\text{Absorbância de células tratadas}}{\text{Absorbância células não tratadas}}$$

4.5 Teste de atividade antimicrobiana in vitro

Os ensaios de atividade antimicrobiana obedeceram ao protocolo padronizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2004) e pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2005; 2012) (FIGURA 10).

Figura 9 - Ensaio de Microdiluição em caldo para determinar a atividade antibacteriana da berberina.



Os testes antimicrobianos foram realizados em capela de fluxo laminar microbiológica, com uso de equipamentos de proteção individual (EPI) e seguindo às boas práticas de laboratório recomendadas pela ANVISA.

4.5.1 Solubilização da amostra

A berberina utilizada no ensaio foi pesada em balança analítica e solubilizado em solução de cremophor a 1 %, a temperatura ambiente com o auxílio de placas de petri e bastões de vidro estéreis.

A solução foi preparada adicionando-se 20 mg de berberina em 20 mL de solução de cremophor® a 1% resultando em uma concentração de 1 mg/mL, posteriormente acondicionadas em frascos de vidro estéreis.

4.5.2 Preparo dos inóculos

Todos os inóculos microbianos em suspensão contendo microrganismos ativos, foram preparados utilizando cepas padrão. Foram utilizadas as estirpes de Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990) e Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 e *Shigella flexneri* ATCC 12022.

Essas espécies foram escolhidas com base em um estudo que avaliou 55 artigos que relatavam sobre infecções de feridas cirúrgicas, os quais classificaram estas espécies como as mais frequentemente relacionadas à infecção de feridas, que seguem com seus respectivos percentuais de frequências como causadoras de infecções em feridas: *Staphylococcus aureus* (39,3 %), *Escherichia coli* (30,4 %), *Pseudomonas aeruginosa* (19,6 %) e *Staphylococcus epidermidis* (17,8 %) (SANTOS et. al. 2016).

Os inóculos foram preparados para uma concentração de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitros (mL) em solução salina estéril a 0,9 %, utilizando-se como parâmetro o tubo 0,5 da escala de McFarland. Depois, esta solução foi submetida à diluição na proporção de 1:20 atingindo uma concentração de $1,5 \times 10^7$

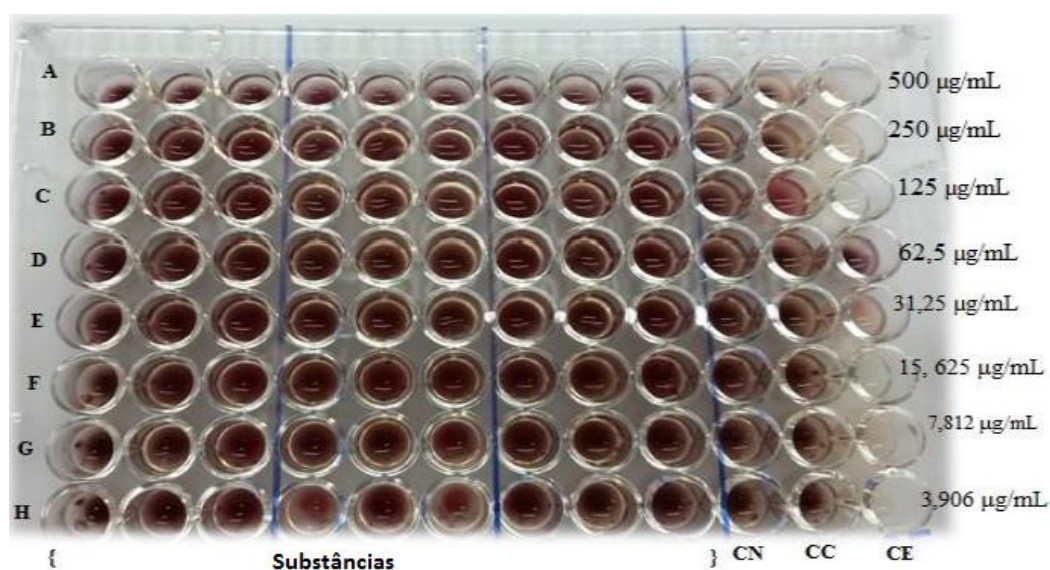
UFC/mL. Ao inocular 10 μL da solução em cada poço da placa utilizada no teste, a concentração final de bactérias fica em 5×10^4 UFC/ poço.

4.5.3 Microdiluição em caldo

A atividade antibacteriana foi determinada utilizando o método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do protocolo adaptado do National Committee for Clinical Laboratory Standard [NCCLS] (CLSI, 2012).

Para realização da técnica foram utilizadas placas estéreis de 96 poços em forma de U que se organizam em 12 colunas numeradas de 1 a 12 e em 8 linhas nomeadas de A a H. Um volume de 100 μL de meio de cultura caldo Mueller-Hinton (CMH), preparado segundo informações do fabricante, foram adicionados em todos os poços da microplaca. Posteriormente, na primeira linha da microplaca foram adicionados 100 μL da solução de berberina na concentração de 1,0 mg/mL, totalizando um volume de 200 μL numa concentração final da substância de 0,5 mg/mL. Então, uma alíquota de 100 μL do conteúdo da linha A foi transferido para os poços da linha B, e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para linha C e assim consecutivamente até que todas as linhas da microplaca recebessem a solução de berberina (Figura 7).

Figura 10 - Figura 6 - Microplaca de 96 poços e concentrações para teste de microdiluição em caldo.



Ao final, obtiveram-se concentrações decrescentes das substâncias começando na linha A em 500 $\mu\text{g/mL}$ e chegando a concentração de 3,9062 $\mu\text{g/mL}$ na linha H. As

colunas 10, 11 e 12 foram reservadas para os testes de controle do experimento, sendo estes respectivamente o controle negativo (solução de cremophor a 1%), controle de crescimento bacteriano (meio caldo Mueller-Hinton) favorecendo a testagem da viabilidade da cepa bacteriana e controle de esterilidade para comprovação da qualidade da esterilização da placa. Em todas três colunas foi realizada a técnica de redução consecutiva da concentração descrita nos parágrafos anteriores.

Posteriormente, foram acrescentados um volume de 10 µL do inóculo bacteriano (5×10^4 UFC/mL) em todos os poços, exceto na coluna 12 por tratar-se do teste de esterilidade, estes já com concentrações distintas. As placas foram fechadas com tampas estéreis de acrílico (fornecidas pelo próprio fabricante) e incubadas a temperatura de 35 °C por 18 h (CLSI, 2012).

Passado o tempo de incubação, foi adicionado a cada um dos poços um volume de 20 µL de uma solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (C₁₉H₁₅CIN₄) a 0,5%. Este é um corante que promove revelação das colônias na solução sem comprometer sua viabilidade. Tornando a solução que o recebeu com coloração avermelhada na presença de microrganismos viáveis.

Então, as placas foram reincubadas por mais três horas a mesma temperatura (35 °C). Ao final deste tempo, foi realizada a leitura destas com base na presença de coloração vermelha dos poços. Onde existiam orifícios vermelhos foi interpretado como presença do microrganismo e prova negativa do efeito inibitório da substância experimental. Da mesma forma, onde inexistia a coloração vermelha foi considerada ausência de microrganismo e consequente prova positiva da ação inibitória da substância sintética frente à bactéria.

Desta forma, foi possível determinar em qual concentração a substância parou de inibir o microrganismo, determinando assim a concentração inibitória mínima da berberina em µg/mL.

A comprovação quantitativa do teste da microdiluição em caldo foi realizada por leitura em espectrofotômetro, com densidade óptica de 492 nm, determinando assim, a absorbância de cada poço antes e depois do acréscimo do inóculo. A equação utilizada foi (GUDIÑA et al., 2010):

$$\% \text{ de inibição do crescimento microbiano} = [1 - (\frac{A_c}{A_0})] \times 100$$

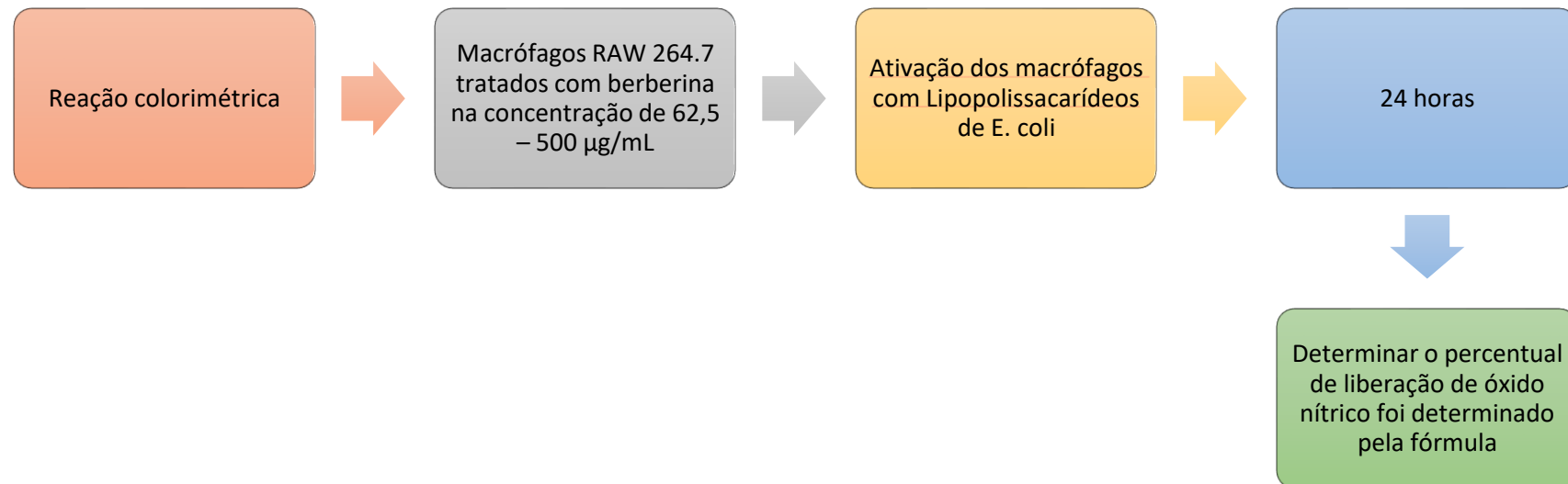
Onde: A_c representa a diferença entre as médias da absorvância dos poços com inóculo, das médias da absorvância dos poços sem inóculo. A_0 representa a absorvância do controle de crescimento microbiano. As substâncias que, quando comparadas com o controle de crescimento, apresentaram o percentual de inibição do crescimento microbiano maior que 80%, foram consideradas possuidoras de propriedades antimicrobianas (HOLETZ et al., 2002).

4.6 Avaliação de atividade anti-inflamatória *in vitro*

A atividade anti-inflamatória da berberina foi avaliada com macrófagos (Raw 264.7) com a finalidade de determinar a produção de óxido nítrico (NO), o qual foi avaliado pela detecção do acúmulo de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares, utilizando uma reação colorimétrica baseado no método de Griess (Cruz et al., 2001; Green et al., 1982). Este método consiste em uma reação colorimétrica na qual o sobrenadante da cultura é incubado com igual volume dos reagentes de Griess. Este reagente é preparado pela mistura de volume de solução de naftiletileno-diamina a 0,1% (Sigma) com a solução de sulfanilamida a 1 % (Sigma) em ácido fosfórico a 2,5%.

As células de macrófagos foram cultivadas em microplacas de 48 poços, numa concentração de $0,6 \times 10^6$ / $0,3 \times 10^6$ por poço respectivamente, e deixadas a estabilizar durante 12 horas a 37°C com 5% de CO₂. Após 12 horas, o meio foi removido e foram adicionados 600 µL de meio de cultura aos poços controle e 588 uL aos restantes poços. A berberina foi solubilizada em DMSO e meio de cultura nas concentrações de 62,5 – 500 µg/mL (FIGURA 12).

Figura 11 - Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* da Berberina.



Após 1 hora, as células foram ativadas com 1µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (serotipo 026:B6) durante 24 horas, nas condições de cultura referidas. Após as 24h, 170 µL de sobrenadante da cultura foram diluídos com igual volume de reagente de Griess numa microplaca Elisa de 96 poços.

A placa foi mantida ao abrigo da luz durante 30 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi lida a 540 nm num leitor automático de microplacas e o percentual de liberação de óxido nítrico foi determinado pela fórmula:

$$\% \textit{ produção de nitritos} = 100 \times \frac{\textit{ Absorbância de células tratadas}}{\textit{ Absorbância células não tratadas}}$$

4.6.1 Método ELISA para dosagem de IL-1β, TNF-α e PGE₂

Os níveis de IL-1β, TNF-α e PGE₂ foram quantificados por ELISA (do inglês, Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), o qual é baseado em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. É considerado como um método de grande sensibilidade e especificidade pelo uso de uma enzima, como a peroxidase, que se liga a um anticorpo específico e reconhece o antígeno alvo, dando origem a um produto colorido a partir desta reação. A dosagem dessas citocinas foi realizada a partir do sobrenadante da cultura de macrófagos RAW 264.7, tratadas ou não com a berberina. Para isto, foram utilizados kits de ELISA comercialmente disponíveis. Os resultados foram expressos em pg/mL

4.7 Determinação de atividade antiglicante in vitro

A realização do teste para determinação do potencial antiglicante de uma substância consiste em produzir o AGE, a partir da junção do BSA mais um açúcar que pode ser ribose, frutose ou glicose.

Precedendo os testes com a berberina foram necessários alguns estudos visando a padronização da técnica tendo em vista que a literatura apresenta diversas formas de produção de AGEs in vitro (BEAULIEU et al., 2010; JHAUMEER-LAULLOO et al., 2012; PEREZ GUTIERREZ et al., 2012; SÉRO et al., 2013).

Os testes para atividade antiglicante in vitro foram realizados em placas estéreis de 96 poços. Antes de iniciar os testes todos os materiais, incluindo todas as soluções, tampão e amostras foram submetidos à luz ultravioleta por 15 minutos, em capelaq de fluxo laminar. Local onde ocorreu o preparo das placas. Além disso, para a realização do teste todos os reagentes e as amostras foram esterilizadas por filtração através de filtros de membrana 0,2 μ m.

Acrescentou-se em cada poço as seguintes soluções nesta ordem:

- 75 μ l de azida sódica 8g/L;
- 37,5 μ l de glicose 800mM;
- 75 μ l de berberina
- 75 μ l de BSA 40mg/mL

Tendo como variação o branco que continha:

- 150 μ l de tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,4;
- 75 μ l de BSA 40mg/mL.

Utilizou-se o controle negativo da fluorescência:

- 125 μ l de tampão fosfato 100mM, pH 7,4
- 75 μ l de azida sódica 8g/L.

E o controle da técnica que segue o padrão sem a amostra a ser analisada. Como controles positivos utilizou-se a quercetina a 2mg/mL, bem como, a berberina, nas seguintes concentração: 2000 μ g, 1000 μ g, 500 μ g, 125 μ g.

As placas quando prontas foram levadas, imediatamente, para a estufa a 37°C, protegida com folha de papel alumínio por 48 horas até início das leituras. Não podendo

ser manipulada até então. A formação de AGEs foi medida por um espectrofotômetro de fluorescência, com excitação em 350nm e emissão em 450nm (BOUSOVÁ et al., 2005; AHMAD AHMED, 2006; BEAULIEU et al. 2010).

Os resultados foram apresentados em porcentagem de inibição e calculada a partir da seguinte equação (SUN et al., 2010):

$$\% \text{ de inibição} = \left[1 - \left(\frac{\text{fluorescência da solução com inibidores}}{\text{fluorescência da solução sem inibidores}} \right) \right] \times 100\%$$

4.8 Desenvolvimento e controle de qualidade da formulação tópica

4.8.1 Formulação do produto

Os cremes são formulações semissólidas com consistência relativamente macia aplicadas ao uso na pele e mucosas, caracterizadas de solução ou dispersão de uma ou mais substâncias ativas em baixas proporções incorporadas a uma base adequada e que são removíveis em água (ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007).

O veículo creme foi escolhido devido a sua relevância no processo de cicatrização, considerando que tem capacidade de prevenir a desidratação do tecido, acelerar a angiogênese e a formação do tecido de granulação, estimular a epitelização, servir como barreira protetora contra microrganismos, promover a diminuição da dor e evitar traumas na troca do curativo. Além disso é uma das formulações mais escolhidas pelos profissionais de saúde durante a realização do curativo por conta de sua facilidade de aplicação e remoção.

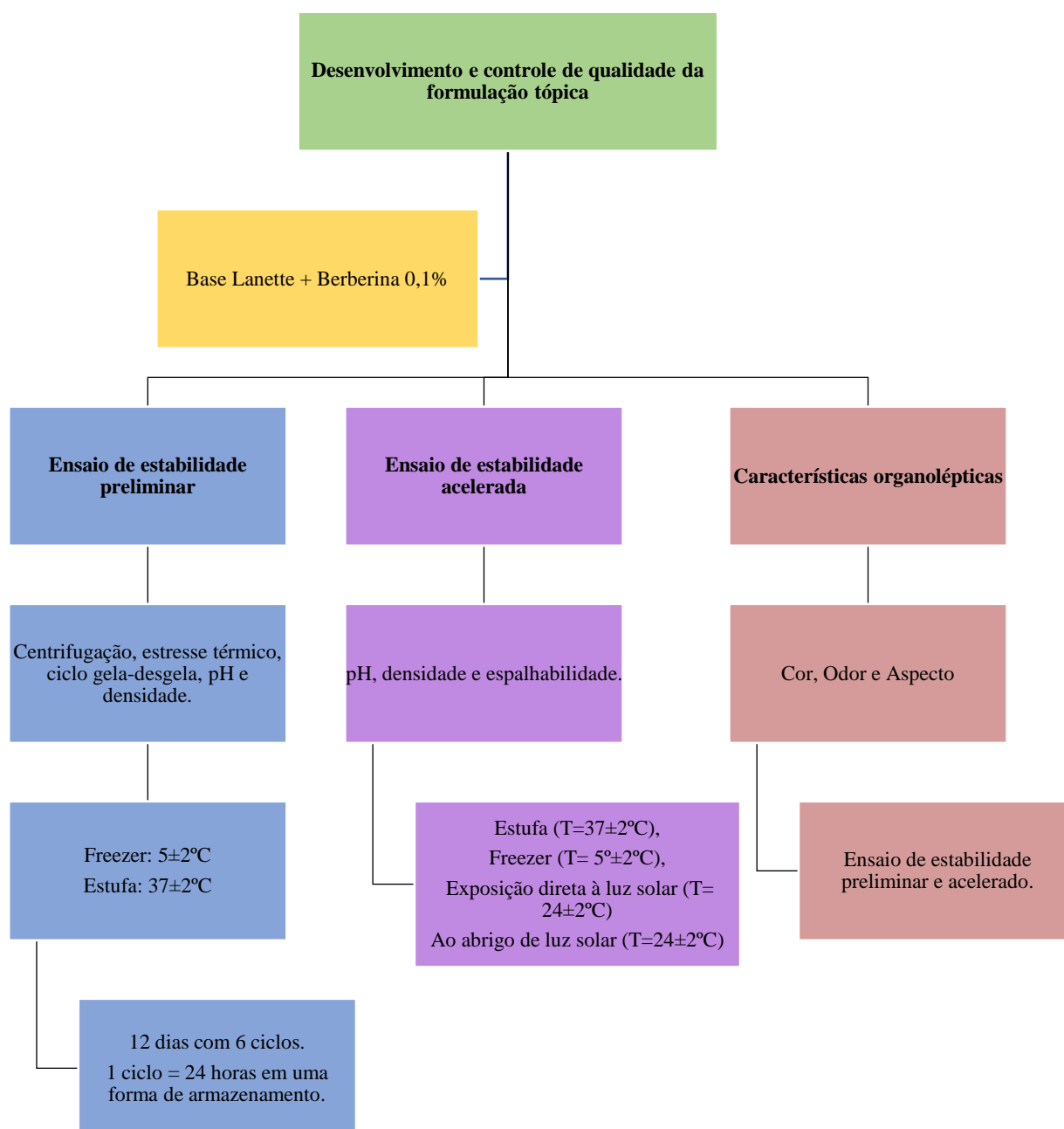
Para a preparação do creme, a berberina foi solubilizada em propilenoglicol (q.s.p) e incorporada em creme lanette sem conservantes (q.s.p.), com a obtenção final de um produto de peso final de 30g e uma concentração final do composto ativo de 0,1% (1mg/mg).

Após obtenção, o produto foi acondicionado em potes de polietileno e procedeu-se aos testes de estabilidade. Os produtos foram divididos em 3 lotes e submetidos a diferentes condições de armazenamento: estufa (T=37°C), Freezer (T= 5°C), exposição direta à luz solar (T= 24°C), ao abrigo de luz solar (T=24°C) e em exposição à radiação luminosa (T= 24°C) (ANVISA, 2004). Foram realizadas avaliações das características organolépticas, estresse térmico, ciclo gela-desgela, teste de centrifugação, potencial hidrogeniônico (pH), densidade e espalhabilidade.

Os testes de estabilidade preliminar foram realizados com 24 horas após o desenvolvimento da formulação e finalizados com 12 dias. Os testes de estabilidade

acelerada e acompanhada foram realizados em 3 tempos: 24 horas após a formulação, 15 dias e 30 dias. Por fim foram realizados os mesmos ensaios de controle de qualidade físico-químicos com uma formulação referência, comercializada no mercado, que possui a mesma finalidade que a formulação desenvolvida, para comparação dos resultados obtidos. (CORDEIRO et al, 2013; SIQUEIRA, 2015) (FIGURA 13).

Figura 12 - Desenvolvimento e controle de formulação tópica à base do alcaloide berberina.



4.8.2 Teste de estabilidade preliminar

O ensaio de estabilidade preliminar tem a finalidade de submeter a formulação desenvolvida a condições extremas de temperatura para acelerar possíveis reações que podem comprometer a eficácia do produto. Foram realizados teste de centrifugação, estresse térmico e ciclo gela-desgela, todos realizados em triplicata (LIMA et al. 2008).

Para o teste de centrifugação, foram utilizados 10g da formulação submetida a ciclos de 1000, 2500 e 3500rpm (rotações por minuto) por 15 minutos em cada rotação em temperatura ambiente.

No teste de estresse térmico, a formulação foi submetida a um processo de aquecimento em banho maria, nas seguintes temperaturas: 40, 50, 60, 70 e 80°C, mantendo-se por 30 minutos em cada faixa.

Para os ciclo gela-desgela, a formulação foi submetida à permanência em temperaturas padronizadas (Freezer: $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ e Estufa: $37\pm 2^{\circ}\text{C}$) por um período de 12 dias correspondendo a 6 ciclos, onde 1 ciclo corresponde a 24 horas submetido a uma condição de acondicionamento, o qual foi iniciado com 24 horas após manipulação do produto.

As amostras foram analisadas quanto às características organolépticas com o objetivo de identificar qualquer instabilidade, alteração da cor ou separação de fases (MONTAGNER, 2004).

4.8.3 Ensaio de estabilidade acelerada

Para determinação do potencial hidrogeniônico (pH), as amostras foram analisadas utilizando o pHmetro marca BEL ENGINEERINGB e modelo W3B, previamente calibrado com as soluções determinadas pelo próprio equipamento. O ensaio foi feito em triplicata e os resultados corresponderam às médias das três medições para cada formulação (CORDEIRO et al, 2013).

A formulação foi submetida ao ensaio de espalhabilidade, a qual é definida como a capacidade de expansão da formulação semissólida frente a uma determinada força (peso) por um tempo definido. Sua determinação é essencial, pois está relacionada à facilidade de aplicação tópica do produto.

O ensaio de espalhabilidade foi constituído por uma placa-molde circular de vidro com orifício circular central contendo 1,2 cm de diâmetro e 0,7cm de espessura (10 cm x 10 cm a placa) que foi colocada sob uma placa de vidro (10 cm x 10 cm)

posicionado sobre papel milimétrico. A formulação foi inserida no orifício e nivelado com auxílio de espátula, a placa móvel foi retirada e sobre a amostra foi colocada uma placa de vidro de peso conhecido, após um minuto foi realizada a leitura dos diâmetros abrangidos pela amostra em posições opostas, depois calculado o diâmetro médio. Este procedimento foi repetido acrescentando-se as placas de vidro com pesos pré-determinados em intervalos de um minuto de uma placa para outra, totalizando 7 placas, (CORDEIRO et al, 2013; SIQUEIRA, 2015).

Para determinar a espalhabilidade da formulação foi utilizada a seguinte fórmula:

$$Ei = \frac{d^2 \times \pi}{4}$$

A densidade da formulação foi realizada por meio de uma proveta de 3mL e balança analítica, e realizada a pesagem, para determinação da densidade, através da adaptação do método descrito na RDC nº 50/2008, utilizando a fórmula abaixo para o cálculo:

$$D = \frac{m}{v}$$

Onde:

D= densidade;

M= massa da formulação (g);

V= volume da amostra na seringa (mL).

Para o ensaio de viscosidade utilizado o viscosímetro digital rotacional de marca Marte e modelo MVD-20. As medidas foram avaliadas de acordo com as velocidades de rotação progressivamente mais altas (10-100 rpm com variação em intervalo de 1 minuto de 10 em 10 rpm) para obter-se a curva ascendente, e o procedimento foi repetido no sentido inverso com velocidades progressivamente mais baixas (100-10 rpm) para obtenção da curva descendente (ANVISA 2004, SIQUEIRA, 2015).

4.9 Análise estatística

Todos os dados foram tabulados em planilhas no Microsoft Excel. Os gráficos foram gerados por meio do programa Microsoft Excel e Graphpad Prism, versão 5. Para os ensaios de viabilidade celular e antiglicante foram utilizados o teste ANOVA e pós-teste Dunett considerando $p < 0,05$. Os ensaios de atividade anti-inflamatória foram

utilizados o ensaio ANOVA e teste de múltipla comparação de Newman-Keuls considerando $p < 0,05$.

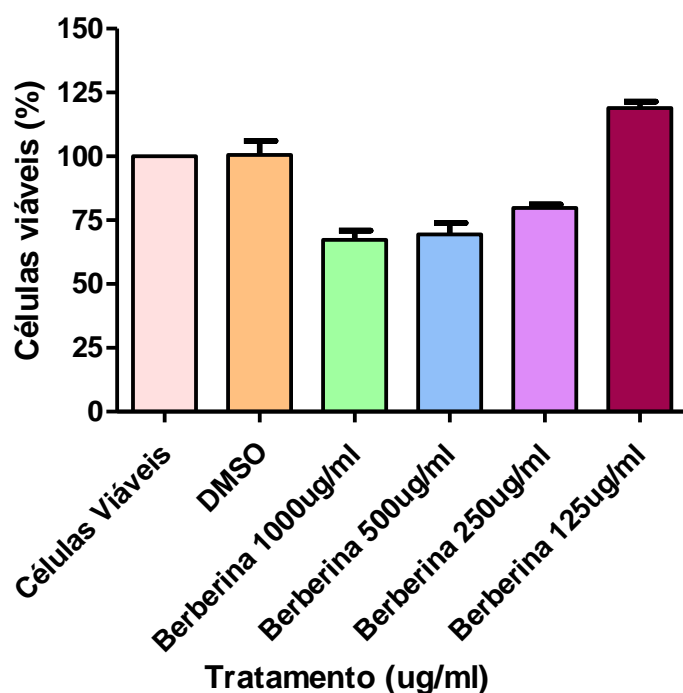
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio de viabilidade celular

Sabe-se que a toxicidade é um dos fatores que limita a liberação e consumo de fármacos, sua avaliação é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias em causar danos à saúde, bem como estabelecer sua aplicabilidade e índice terapêutico (VALADARES, 2006).

Neste estudo, foi utilizado o método colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT), teste *in vitro* capaz de definir a habilidade intrínseca da substância em causar a morte celular através de danos as funções básicas das células (EISENBRAND, 2002), para isto foram utilizados Macrófagos J774 tratados durante 48 horas com o isolado berberina nas concentrações: 1000, 500, 250, 125 μ g/mL (Figura 14).

Figura 13 - Citotoxicidade da berberina frente à linhagem de macrófagos J774.



Fonte: Dados representados por média \pm EPM (n=3). Viabilidade celular do alcaloide berberina não houve diferença estatisticamente significativa do alcaloide em comparação aos controles após ANOVA e pós-teste Dunnett considerando $p < 0,05$. Dados da pesquisa, 2021, Maceió – AL.

Os macrófagos J774 ao serem tratados por berberina em quatro concentrações diferentes não apresentaram citotoxicidade relevante. Na concentração de 1000 μ g/mL,

o percentual de células viáveis foi de 67,35%. Quando as células foram tratadas com a concentração de 500 µg/mL foi observado o percentual de cerca de 69,38% das células viáveis.

Já na concentração de 250 µg/mL foi observado o percentual de 79,85% de viabilidade celular. Com a redução de concentração para 125µg/mL foi observado que além de não haver citotoxicidade para as células tratadas, a berberina promoveu um aumento no percentual de células viáveis no valor de 118,93%.

Em um estudo, que avaliou a citotoxicidade da berberina sintética diante de fibroblastos de roedores, foi evidenciado que a substância se apresentou tóxica em concentrações superiores a 100 µg/mL, enquanto em concentrações inferiores a este valor, o alcaloide exibiu viabilidade celular superior a 60% e conseguiu atingir valores semelhantes ao do controle utilizado no ensaio (GU et al., 2015).

No estudo de Silva et al. (2016), o alcaloide sintético em questão, numa concentração abaixo de 100µg/ml, não apresentou citotoxicidade significativa ($p < 0,05$) em comparação ao controle de células não tratadas quando foi utilizado para tratar fibroblastos durante um período de 24 horas no ensaio de MTT.

Estas pesquisas, estão de acordo com os resultados apresentados no presente estudo, onde o alcaloide apresentou resultados semelhantes aos exibidos na literatura, os quais confirmam a baixa toxicidade de berberina frente aos macrófagos e fibroblastos, sendo ainda capaz de proliferar as mesmas a depender de sua concentração.

Os macrófagos são responsáveis pela fagocitose de corpos estranhos no leito da lesão, bem como na ativação dos fibroblastos para a fase seguinte do processo e participação na formação de novos vasos. Já os fibroblastos, surgem no fim da segunda fase do processo de cicatrização, exercendo como principal e importante função a síntese de colágeno iniciada no período inflamatório (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A capacidade da berberina em manter macrófagos e fibroblastos viáveis comprovada neste e em outros estudos, sugere seu potencial em manter a viabilidade destas células, fundamentais em diferentes fases do processo de cicatrização e um produto promissor para lesões cutâneas, visto que se trata de células de grande importância no processo de cicatrização.

5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro

Quanto a atividade antibacteriana da berberina, no estudo em questão, o alcaloide foi testado frente as principais estirpes de bactérias Gram positivas e Gram negativas capazes de provocar infecção em feridas cutâneas.

A amostra foi testada numa concentração de 500 µg/ml e nos resultados obtidos exibiu atividade antibacteriana frente aos seis tipos de microrganismos testados, apresentando uma CIM que variou de 250 - 62,5 µg/ml e um percentual de inibição de mais de 99% para todas as estirpes bacterianas (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) da berberina frente à 6 estirpes bacterianas.

Concentração Inibitória Mínima – CIM		
Estirpes bacterianas	Concentração (µg/ml)	Percentual de inibição (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	99,87%
<i>Staphylococcus epidermides</i>	125	99,83%
<i>Escherichia coli</i>	250	99,65%
<i>Escherichia cloacae</i>	125	99,34%
<i>Shigella flexneri</i>	62,5	99,59%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62,5	99,73%

Fonte: Dados da pesquisa, 2021, Maceió – AL.

A berberina apresentou melhor ação antibacteriana frente à estirpe *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella flexneri*, pertencentes ao grupo das Gram negativas, com uma CIM de 62,5 µg/ml. Entretanto, essa ação não foi similar frente a espécie *Escherichia coli* e *Escherichia cloacae*, pertencente ao mesmo grupo, onde o alcaloide foi capaz de inibir estes microrganismos numa maior concentração.

Quando testado frente à microrganismos pertencentes ao grupo das Gram positivas, a berberina foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermides* com CIM de 125 µg/ml.

Derivados de Berberina foram testados frente a 8 estirpes bacterianas e 5 linhagens dos fungos, os quais apresentaram-se ativos frente a todos os microrganismos exibindo uma CIM que variou de 1 - 256 µg/mL. Frente a *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, os derivados de berberina exibiram uma CIM abaixo de 64 µg/mL (WEN et al., 2016). Estes dados confirmam os resultados apresentados no estudo em questão, onde a berberina isolada da fração metanólica da espécie *Argemone mexicana* L.

apresentou-se ativa frente as 3 estirpes bacterianas mencionadas em Wen et al. (2016), com uma CIM que variou de 62,5 - 125 µg/mL.

Staphylococcus aureus é uma bactéria esférica, Gram-positiva e comumente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. No entanto, esse patógeno é capaz de causar infecções que variam de simples a graves (SANTOS et al., 2007).

É considerada como um dos mais importantes patógenos causadores de processos infecciosos, pois é capaz de abranger lesões superficiais até severas infecções sistêmicas. Sua virulência é resultado da existência de inúmeras toxinas; enzimas e proteínas associadas à sua parede celular que combinados causam a invasão tecidual e a sobrevivência no sítio infeccioso; além de ter forte resistência adquirida aos mais diversos antimicrobianos (CATÃO et. al. 2010).

Pacientes colonizados por microrganismos são submetidos ao isolamento durante o período de internação hospitalar. Dentre estes microrganismos, a espécie *S. aureus* ganha destaque por ser de grande virulência ao paciente, principalmente, aos imunodeprimidos, tendo em vista que a contaminação com esse patógeno pode provocar diversos processos infecciosos (SPERANÇA et al., 2010).

No presente estudo, a berberina exibiu atividade frente a estirpe *S. epidermidis*, resultado este que corroborou com o apresentado nos estudos de Wang *et al.*, (2009a) e Wang et al. (2009b), onde foi evidenciado a inibição eficaz da formação do biofilme deste microrganismo em superfícies de próteses ósseas.

A estirpe de *S. epidermidis* tem capacidade de se prender a superfícies de polímeros, dando origem a biofilmes que são importantes elementos de patogenicidade que causam a redução da resposta imune e capacidade de defesa do hospedeiro (TRABULSI, 2006). Devido à produção do biofilme e seu poder de virulência, os microrganismos desta espécie são frequentemente associados com a diminuição da sensibilidade aos antibióticos utilizados em infecções (NORMA et. al. 2013).

Já a espécie *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista e bastante versátil capaz de crescer numa grande variedade de ambientes. É responsável por uma ampla gama de infecções em hospedeiros imunocomprometidos. Entre as infecções mais significativas estão aquelas localizadas em tecidos moles, como é o caso de feridas crônicas e queimaduras (TURNER et. al. 2014).

No estudo de Morita et al. (2016), a berberina foi utilizada com a finalidade de diminuir a resistência de antibióticos como: eritromicina, ciprofloxacino, tetraciclina, amicacina e getamicina frente a diversas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes

a estes medicamentos, onde a associação deste alcaloide com os antibióticos conseguiu reduzir em até 8 vezes a concentração inibitória mínima destes antibióticos.

Quanto a atividade antibacteriana da berberina frente à *E. coli* foi evidenciada no estudo em questão, onde o composto alcaloide exibiu uma CIM de 250 µg/mL. Este resultado corrobora com outros encontrados na literatura, como o estudo de Bandyopadhyay et al. (2013), onde a berberina sintética se mostrou ativa frente a diversas cepas resistentes de *E. coli*.

A berberina apresenta atividade antibacteriana devido a sua capacidade de inibir a síntese de proteínas que estão associadas no crescimento das bactérias, bem como, é capaz de bloquear a divisão e desenvolvimento desses microrganismos (KANG et al., 2015).

Estes resultados demonstram o potencial antibacteriano existente no alcaloide berberina, o qual apresenta-se com uma atividade eficaz frente às principais bactérias Gram positivas e negativas, o qual pode ser utilizado de forma isolada ou em associações com outros antibióticos como terapia alternativa de infecções resistentes a estes medicamentos.

5.3 Avaliação de atividade anti-inflamatória *in vitro*

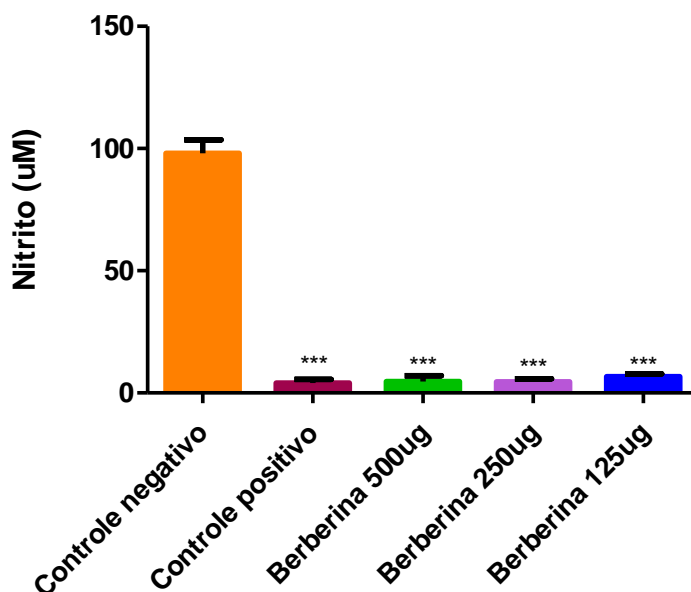
A inflamação é uma resposta do organismo a qualquer injúria tecidual, envolvendo vários tipos de células de defesa, sendo as principais os macrófagos. Com a ativação dessas células há a produção de mediadores inflamatórios, responsáveis pela sinalização e regulação do processo inflamatório e por isso os mediadores inflamatórios liberados a partir da ativação dos macrófagos são alvos considerados promissores para o tratamento de doenças inflamatórias (SEO et al., 2016).

Em Araujo (2017), a berberina apresentou uma atividade estatisticamente significativa durante o período inflamatório do processo de cicatrização, sugerindo que seu potencial cicatrizante está diretamente ligado à regulação de mediadores inflamatórios liberados durante este período do processo de cicatrização.

No presente estudo, com a finalidade de avaliar o mecanismo de ação da berberina durante o processo de inflamação foi realizado o ensaio de atividade anti-inflamatória *in vitro* para avaliar a influência da berberina na produção de nitritos e citocinas (TNF α , IL-1 β , PGE-2) que surgem com a ativação de macrófagos de linhagem 264.7 à presença de agentes patogênicos.

Sobre a avaliação na produção de nitrito em macrófagos de linhagem 264.7, que foram estimulados com LPS + IFN- γ , a berberina foi utilizada como tratamento em três concentrações 500 μ g/mL, 250 μ g/mL e 125 μ g/mL com a finalidade de avaliar o impacto na produção de nitritos após o estímulo inflamatório (FIGURA 15).

Figura 14 - Efeito da berberina sobre a produção de nitrito em macrófagos RAW 264.7 estimulados por IFN- γ (50 UI/mL) e LPS (100 μ g/mL).



Dados representados por média \pm EPM (n=3). ***p<0,001 indica uma diferença significativa entre o grupo estimulado por LPS + IFN- γ (Controle negativo) e os grupos tratados com berberina. Realizado teste ANOVA One-way e Teste de Múltipla Comparação de Newman-Keuls.

Todas as concentrações de berberina conseguiram reduzir os níveis de nitritos de forma estatisticamente significativa (p=0,001) quando comparadas ao controle negativo do teste em questão. A berberina conseguiu reduzir os níveis de nitritos em 95,20% na concentração de 500 μ g/mL; ao reduzir pela metade essa concentração (250 μ g/mL), o percentual aumentou para 95,40% e com a menor concentração (125 μ g/mL) do alcaloide utilizado, foi observado a redução de 93,16% dos níveis de nitritos dos macrófagos tratados.

Além disso, foi observado que ao comparar os resultados obtidos nas diferentes concentrações de berberina com o controle positivo (dexametasona), a produção de nitritos se apresentou de forma similar, não exibindo diferença estatística entre as substâncias (p>0,05).

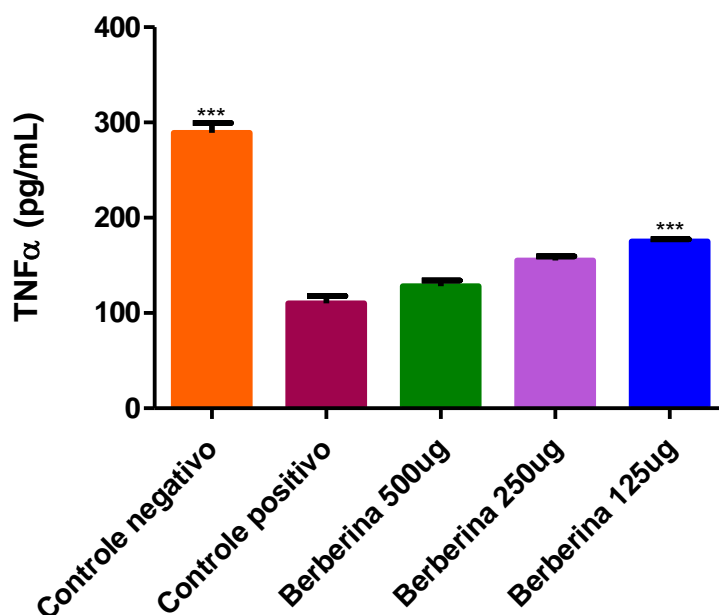
Em estudo realizado por El-Wahab et al. (2013) com a finalidade de determinar a atividade antioxidante e anti-acetilcolinesterase, foi observada a redução nitritos após o tratamento de macrófagos com o alcaloide berberina extraído da espécie vegetal *Berberis vulgaris*, corroborando com os resultados obtidos no presente.

Os resultados obtidos no presente estudo sobre a redução na produção de nitritos por meio do tratamento com berberina evidenciam e fortalecem seu potencial como agente tópico anti-inflamatório no processo de cicatrização.

Ressalta-se que substâncias que consigam exercer esta atividade, é um potente candidato para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças inflamatórias (SHIN et al., 2015).

Ao avaliar a produção de $TNF\alpha$ pelos macrófagos ativados por LPS+IFN- γ , verifica-se que as 3 concentrações de berberina promoveram uma diminuição que variou de 44,29% - 49,13%. Além disso, todas as concentrações apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas ao controle negativo ($p < 0,001$) (FIGURA 16).

Figura 15 - Efeito da berberina sobre a produção de IL-1 β em macrófagos RAW 264.7 estimulados por IFN- γ (50 UI/mL) e LPS (100 ug/mL).

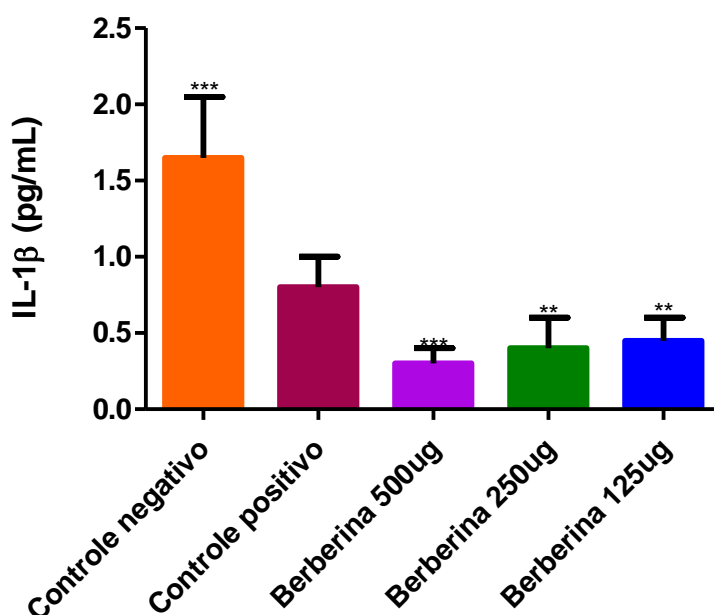


Dados representados por média \pm EPM (n=3). *** $p < 0,001$ indica uma diferença significativa entre o grupo estimulado por LPS + IFN- γ (Controle negativo) e os grupos tratados com berberina. Realizado teste ANOVA One-way e Teste de Múltipla Comparação de Newman-Keuls.

Ao realizar a comparação com o controle positivo foi observado que nas concentrações de 500µg/mL e 250µg/mL, o percentual de redução de TNF α foi similar com o controle positivo utilizado no teste, visto que não foi observado diferença significativa entre eles. No entanto, ao reduzir a concentração de berberina para 125µg/mL, observou-se que a redução dessa citocina foi menor em comparação a dexametasona, exibindo uma diferença de 11,07% indicando a superioridade do controle positivo em comparação a berberina na concentração de 125µg/mL ($p < 0,001$).

Quanto a produção de IL-1 β , a berberina nas concentrações de 500µg/mL, 250µg/mL e 125µg/mL reduziram de forma significativa os níveis de IL-1 β ($p < 0,001$) quando comparadas ao controle negativo e controle positivo. A redução variou de 18,18% - 27,27%, exibindo percentuais menores que o do controle positivo, onde os macrófagos foram tratados com dexametasona e apresentou uma redução de 48,47% nos níveis da citocina em questão (FIGURA 17).

Figura 16 - Efeito da berberina sobre a produção de IL-1 β em macrófagos RAW 264.7 estimulados por IFN- γ (50 UI/mL) e LPS (100 ug/mL).



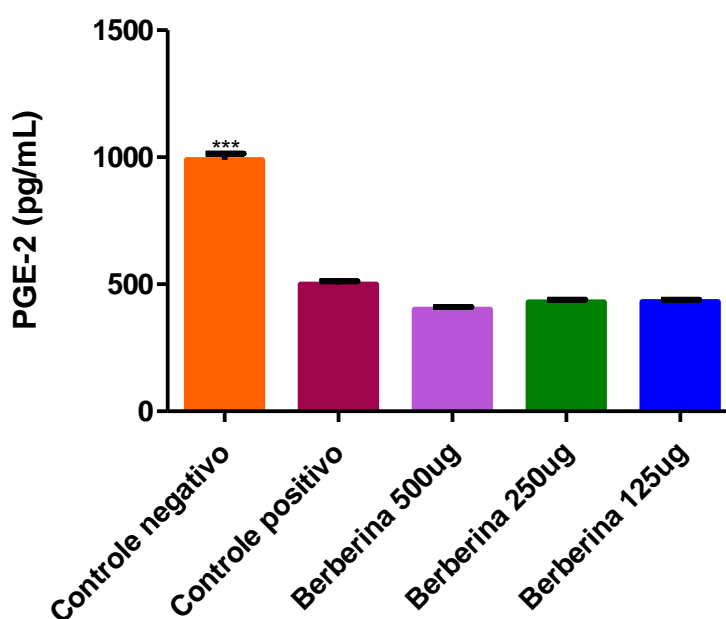
Dados representados por média \pm EPM ($n=3$). *** $p < 0,001$ indica uma diferença significativa entre o grupo estimulado por LPS + IFN- γ (Controle negativo) e os grupos tratados com berberina. ** $p < 0,01$ indica uma diferença significativa entre as concentrações de 250µg/ml e 125µg/ml e o controle positivo. *** $p < 0,001$ indica uma diferença significativa entre a concentração de 500µg/ml de berberina e o controle positivo. Realizado teste ANOVA One-way e Teste de Múltipla Comparação de Newman-Keuls.

Conforme resultados exibidos no presente estudo, diferentes concentrações do alcaloide berberina conseguiu reduzir de forma significativa os níveis de TNF- α e a IL-

1 β . Considerando que essas citocinas são responsáveis por ativar a imunidade celular com a finalidade de regular o processo inflamatório (SIBI; RABINA, 2016), o que pode apontar para possíveis mecanismos de atuação da berberina.

A Figura 18, apresenta o efeito que as três concentrações de berberina exibiram quanto a produção de PGE-2 em cultura de macrófagos RAW 264.7. Todas as concentrações influenciaram de forma significativa ($p < 0,001$) na redução da produção de PGE-2 em comparação ao grupo de controle negativo. A berberina apresentou uma redução que variou de 40,44% - 43,57%, valores estes que não apresentaram diferença significativa em comparação a redução com o tratamento feito por dexametasona (50,45%) ($p > 0,05$).

Figura 17 - Efeito da berberina sobre a produção de PGE2 em macrófagos RAW 264.7 estimulados por IFN- γ (50 UI/mL) e LPS (100 ug/mL).



Dados representados por média \pm EPM ($n=3$). *** $p < 0,001$ indica uma diferença significativa entre o grupo estimulado por LPS + IFN- γ (Controle negativo) e os grupos tratados com berberina. Realizado teste ANOVA One-way e Teste de Múltipla Comparação de Newman-Keuls.

A PGE-2 é uma prostaglandina gerada pela ciclooxygenase-2 (COX-2), que atua na resposta inflamatória ocasionando dor, febre, inchaço e rigidez, logo, a descoberta de substâncias que regulem sua resposta inflamatória representa uma importante abordagem terapêutica para o tratamento de desordens inflamatórias (VYSAKH et al., 2018), principalmente para lesões cutâneas que evoluem para a cronicidade com uma resposta inflamatória de curso lento.

Substâncias que conseguem controlar e manter de forma adequada a resposta inflamatória de uma lesão contribuem para uma melhor formação do tecido de granulação e a adequada transição para as fases seguintes do processo de cicatrização. Resposta inflamatória exacerbada libera uma alta carga de espécies reativas de oxigênio provocando estresse oxidativo e prolongam a fase de inflamação ocasionando danos ao tecido (WANG et al. 2019).

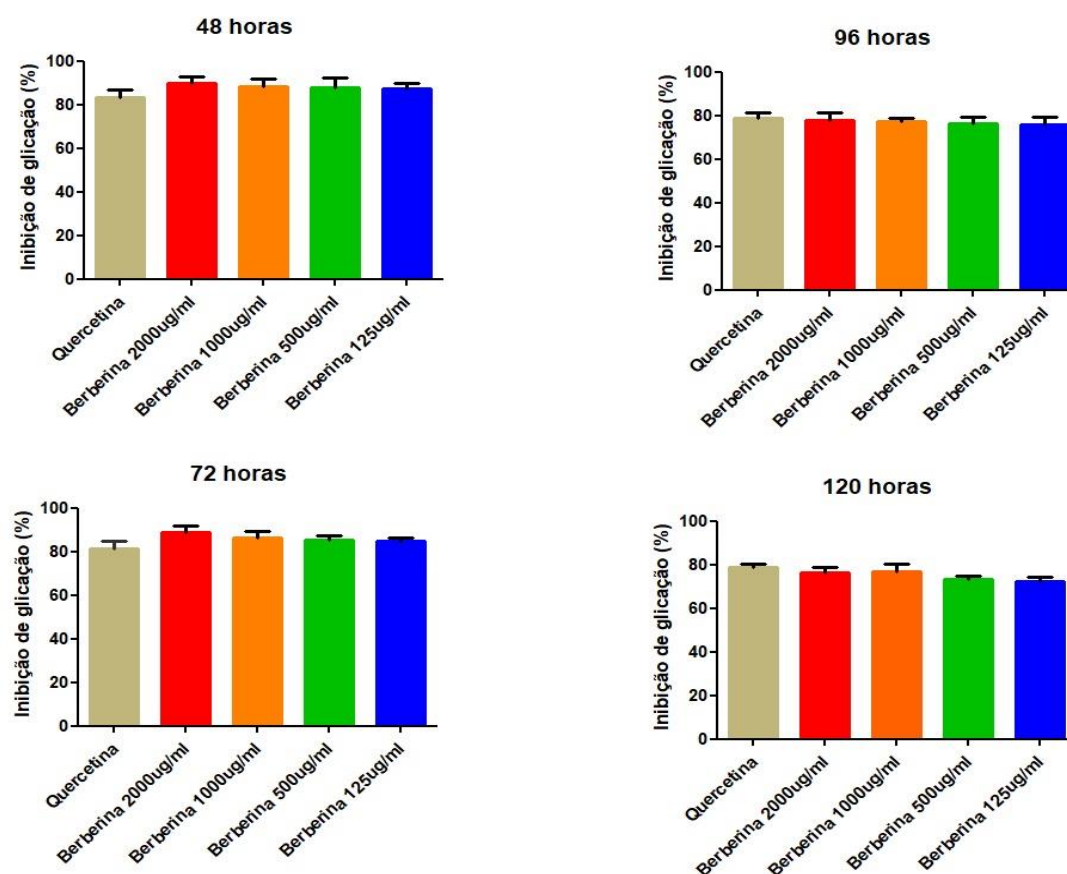
Os resultados obtidos com o ensaio de atividade anti-inflamatória *in vitro* para o tratamento de macrófagos ativados com LPS+IFN- γ para uma resposta inflamatória e tratados com diferentes concentrações de berberina (500 μ g/mL, 250 μ g/mL e 125 μ g/mL) se mostraram promissores para utilizar este alcaloide como princípio ativo de uma cobertura para o tratamento de feridas crônicas.

5.4 Avaliação da atividade antiglicante

Durante o processo de cicatrização de feridas, a presença de AGEs influencia no tempo de fechamento da lesão, além de interferir na angiogênese e na formação do tecido de granulação (RUTTER, SELL, FRASER, 2003). Isso acontece, porque há um acúmulo de AGE retido e circulante no tecido, causando altas respostas inflamatórias e apoptose das células produtoras de matriz (GRAVES, LIU, ALIKHANI, 2006).

A utilização de glicose e BSA para avaliar a glicação não enzimática *in vitro* é bastante utilizado, visto que as proteínas podem ser modificadas quando expostas a açúcares reduzidos durante a glicação espontânea (SUN et al. 2010). No presente estudo, foi utilizado o modelo BSA-glicose com a finalidade de identificar o potencial antiglicante da berberina nas concentrações de 1000 μ g/ml, 500 μ g/ml, 125 μ g/ml (FIGURA 19).

Figura 18 - Inibição da formação de AGEs formados de glicose-BSA pela berberina nas concentrações de 1000µg/ml, 500µg/ml, 125µg/ml pelo período de 48, 96, 72 e 120 horas.



Dados representados por média \pm EPM (n=3). Inibição da formação de AGEs formados de Glicose-BSA pelo alcaloide berberina nas concentrações 1000µg/ml, 500µg/ml, 125µg/ml de não houve diferença estatisticamente significativa do alcaloide em comparação ao controle Quercetina após ANOVA e pós-teste Dunnett considerando $p < 0,05$.

Como padrão, foi utilizada a quercetina na concentração de 2000µg/ml, a qual conseguiu inibir 83,20% de glicação durante o período de 48 horas. Neste mesmo período, as quatro concentrações de berberina testadas, apresentaram um percentual de inibição maior que variou de 87,29% - 90,04%, mas que estatisticamente não apresentaram diferença significativa quando comparado ao controle utilizado.

No período de 72 horas, o potencial de inibição de glicação das quatro concentrações de berberina foram maiores em comparação a quercetina. A berberina apresentou uma variação de 84,97% - 89,06% nas concentrações de 125µg/ml, 500µg/ml, 1000µg/ml e 2000µg/ml, respectivamente. A quercetina apresentou um

percentual de 81,24% e embora tenha apresentado valor menor de inibição, não foi observada diferença estatisticamente significativa.

Durante a avaliação no período de 96 horas foi observado que a berberina apresentou uma redução na sua atividade de inibição de glicação que variou de 75,85% - 78,07% enquanto a quercetina teve um percentual de 79,04% de inibição de glicação. Apesar do controle quercetina ter exibido uma inibição maior que as concentrações de berberina, os percentuais apresentaram-se similares sem diferença estatística.

No último período de avaliação, com 120 horas de teste, o percentual de inibição de glicação da berberina continuou reduzindo e variou de 72,13% - 76,55%. A quercetina apresentou uma leve redução com um percentual de 78,89%. Os valores analisados no tempo de 120 horas não apresentaram diferença significativa quando comparados.

Os AGEs atuam sobre diversos fatores que interferem no processo de cicatrização através da inflamação crônica em feridas como o pé diabético, uma vez que existe um ambiente de hiperglicemia para favorecer as reações de glicação e o seu acúmulo na lesão (MENG et al., 2019).

O acúmulo de AGEs em feridas diabéticas provoca à expressão de algumas moléculas pró-inflamatórias como endotelina-1, TNF- α e MMPs. A presença desses compostos em um ambiente hiperglicêmico agrava o processo inflamatório retardando o processo de cicatrização (YANG et al., 2019).

Estudo pré-clínico (WANG et al., 2019) aponta que atuar no bloqueio da interação entre AGEs e seu receptor RAGE promove uma resposta inflamatória adequada já na fase inicial do processo de cicatrização de feridas, refletindo uma melhora na secreção de fatores inflamatórios, infiltração de leucócitos inflamatórios e na limpeza de detritos de neutrófilos por macrófagos.

Terapias anti-AGE tópicas estão sendo desenvolvidas como estratégias para o tratamento cicatrizante de feridas crônicas, como é o caso da aplicação tópica de agentes antioxidantes associados a nanopartículas de ouro, que reduziu significativamente a expressão da proteína RAGE induzida por AGE em fibroblastos, bem como, acelerou o processo de cicatrização de ferida crônica regulando a angiogênese e os efeitos anti-inflamatórios (CHEN, CHEN, YAO, 2012).

Considerando que para a formação dos AGEs é necessário ocorrer um processo chamado glicação, ou reação de Maillard, em que um açúcar reduzido se ancora em um aminoácido livre, formando assim uma base de Schiff, que é um produto estável e

reversível (MAILLARD, 1912). Os resultados do presente estudo se mostram promissores, considerando que a berberina conseguiu inibir essa primeira fase do processo de formação de AGEs.

5.5 Formulação e ensaios de estabilidade da formulação

A formulação tópica foi desenvolvida utilizando o veículo creme onde houve a incorporação do alcaloide Berberina, resultando em uma formulação de consistência macia e de coloração amarelada com uma adequada homogeneidade entre o creme-base e o alcaloide (Figura 20). As formulações foram desenvolvidas em triplicatas e submetidas aos testes de estabilidade preliminar e acelerada.

Figura 19 - Formulação tópica em creme à base de berberina para cicatrização de feridas cutâneas.



Fonte: Dados da pesquisa, Maceió, 2021.

As formulações foram envasadas em bisnagas de alumínio com a finalidade de avaliar também a compatibilidade do produto com a embalagem sugerida, uma vez que coberturas em cremes utilizadas no tratamento de feridas são comercialmente vendidas nestas embalagens, pois facilitam sua aplicação e durabilidade do produto ao longo do uso.

Dentre os testes de controle de qualidade de um produto farmacêutico, em especial, a estabilidade é uma importante avaliação que avalia a qualidade, segurança e eficácia de um produto farmacêutico ao longo do seu prazo de validade.

Os testes de estabilidade de formulações são importantes para determinação das condições de estocagem, e garantia de validade, visto que os produtos farmacêuticos possuem uma alta complexidade de moléculas e são suscetíveis às alterações físicas e químicas (Kopleman e Ausgsburger, 2001).

As formulações farmacêuticas apresentam energia interna e podem reagir entre si, mediados ou não por fatores intrínsecos, relativos à formulação (hidrólise, oxidação, fotólise, pH, tamanho da partícula e incompatibilidade) e extrínsecos, relativos a fatores ambientais (temperatura, umidade, gases atmosféricos e radiações) (Rodrigues, 2007).

No presente estudo, as formulações em triplicata, foram submetidas ao teste preliminar de estabilidade, onde foram realizados a centrifugação, estresse térmico e ciclo gela-desgela. Quando submetidas à centrifugação e ao estresse térmico, as formulações mantiveram-se estáveis e seguiram para o ciclo gela-desgela no período de 12 dias com avaliação inicial e final do pH, densidade e características organolépticas.

Quanto as características organolépticas de odor, cor e aspecto no início e fim do ciclo não foram observadas alterações na formulação desenvolvido. Na avaliação do pH e densidade não foram observadas alterações relevantes na formulação do produto durante o início e fim do ciclo gela-desgela, conforme apresentado na tabela 4.

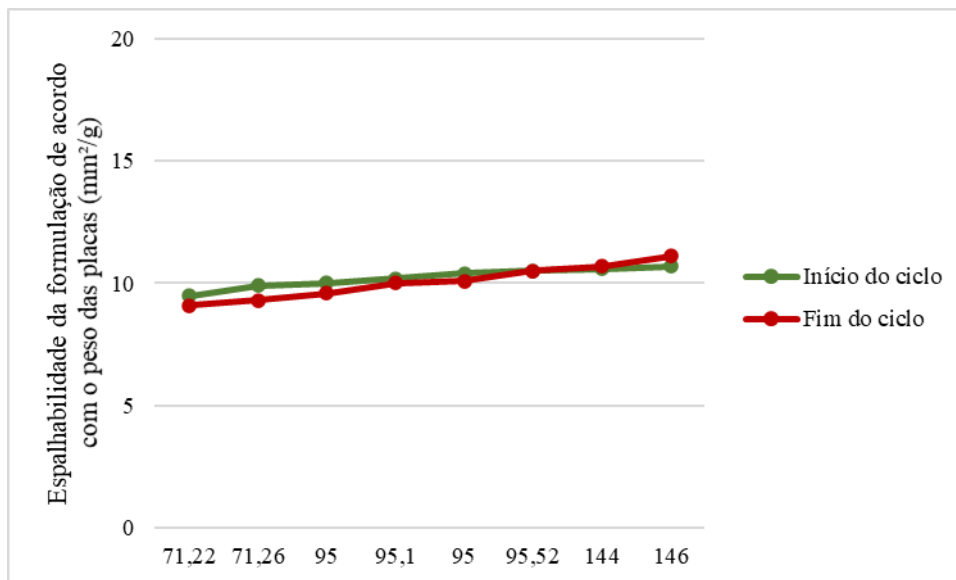
Tabela 2 - Determinação do pH e densidade, no início e término do ciclo gela-desgela.

	Formulação tópica	
	pH	Densidade
Início do ciclo	4,7	0,96g/mL
Fim do ciclo	5,0	1,06g/mL

Fonte: Dados da pesquisa, 2021, Maceió – AL.

A espalhabilidade da formulação realizada no início e fim do ciclo gela-desgela está representada na Figura 21, foi observado um aumento desta espalhabilidade, como esperado, à medida que os pesos de placas foram adicionados e essa elevação não provocou instabilidade da amostra ao longo das análises.

Figura 20 - Espalhabilidade da formulação tópica no início e fim do ciclo gela-desgela.



Fonte: Dados da pesquisa, 2021, Maceió – AL.

Após os testes de estabilidade preliminar, a formulação foi submetida aos testes de estabilidade acelerada nas condições de estufa ($T=37^{\circ}\text{C}$), Freezer ($T=5^{\circ}\text{C}$), ao abrigo de luz solar ($T=24^{\circ}\text{C}$) e em exposição à radiação luminosa ($T=24^{\circ}\text{C}$) em 3 tempos (24 horas, 15 dias e 30 dias). As amostras foram submetidas a avaliação de características organolépticas, densidade, pH e espalhabilidade.

Quanto as características organolépticas foram observadas alterações apenas na amostra que foi exposta à luz solar de forma direta (figura 22), já no tempo de 24 horas, a formulação sofreu alteração na cor, com 15 dias foi observado um maior escurecimento na coloração e alteração no odor e consistência da formulação que se manteve com essas características até o último dia de análise.

Figura 21 -Formulação submetida à radiação luminosa.



Fonte: Dados da pesquisa, 2021, Maceió -AL.

Durante o desenvolvimento de um fármaco, várias são as circunstâncias que podem causar a degradação dos princípios ativos da formulação. A luz é um dos fatores que contribuem para desencadear reações de degradação, como é o caso da oxidação (MIRCO, 2007). O processo oxidativo afeta várias substâncias, como os alcaloides e envolve a presença de radicais livres, os quais contribuem para o aceleração da oxidação e dessa forma a deterioração da substância manipulada (POMBAL, 2010).

O pH, um dos testes realizados para avaliar a estabilidade preliminar e acelerada da formulação, é um aspecto de grande relevância no processo de cicatrização, já que uma lesão alcança a cura em um meio ácido, por meio de diversas respostas fisiológicas, como é o caso da produção de ácido lático, enquanto as feridas crônicas possuem um pH alcalino, o que torna que tem o seu processo de cicatrização retardado apresentam um pH alcalino e conseqüente retardo no processo de cura da lesão (SANTOS et al., 2012).

A pele precisa de um ambiente ácido para garantir a defesa inespecífica e de impermeabilidade frente a flora residente deste órgão, por isso, manter o pH em nível acidez adequado é fundamental. Os valores do pH podem variar entre 4,4 e 5,9 e pode

sofrer interferência de acordo com o indivíduo, região do corpo, idade, etnias, entre outros fatores (YAMADA, YAMADA, 2015).

Algumas coberturas utilizadas no tratamento de feridas agudas ou crônicas tem sua eficácia prejudicada por apresentarem variações em seu pH e muitas vezes contribuindo para modular o meio da lesão para um ambiente alcalino (MCARDLE; LAGAN; MCDOWELL, 2018). Por isso, observa-se a realização de estudos que desenvolvam formulações capazes de modular o pH da lesão proporcionando um ambiente mais alcalino e conseqüente um favorecimento no processo de cicatrização.

Sobre a avaliação do pH da formulação ao longo do ensaio de estabilidade acelerada foi observada uma variação de 5,1 a 5,9 nas condições de geladeira, estufa e ao abrigo da luz. Já a amostra que foi submetida a exposição direta solar apresentou uma elevação expressiva saindo de um pH ácido de 5,2 para 7,6 corroborando com as alterações organolépticas que foram observadas no presente estudo (Tabela 3).

Tabela 3 - pH da formulação submetido a diferentes condições de acondicionamento.

	pH da formulação tópica			
	Estufa	Freezer	Ao abrigo da luz solar	Exposição direta à luz solar
24 horas	5,2	5,3	5,1	5,9
15 dias	5,4	5,2	5,3	6,5
30 dias	5,8	5,9	5,2	7,6

Fonte: Dados da pesquisa, 2021, Maceió - AL.

No presente estudo, observa-se que a formulação tópica desenvolvida exibiu um pH ácido e o manteve em diferentes condições de acondicionamento. Estes resultados fortalecem a possibilidade e eficácia de uso deste produto como cobertura de feridas cutâneas, uma vez que sugerem sua capacidade de modular o meio alcalino existente na lesão e acelerar o processo de cicatrização.

Estudos que desenvolveram coberturas com pH ácido exibiram favorecimento no processo de cicatrização de lesões crônicas, onde conseguiram reduzir o pH alcalino da lesão e com isso foi observado um aumento na velocidade de migração celular, elevação de porcentagem de epitelização das lesões e redução no tamanho das lesões (GETHIN; COWMAN; CONROY, 2008; KOEHLER et al., 2017).

Formulações que possuem o pH ácido são coberturas promissoras para o tratamento de feridas crônicas, já que favorece um ambiente desfavorável para a

instalação de infecção, proporciona a proliferação de fibroblastos e formação do tecido de granulação indispensáveis para a recuperação do tecido lesado (ROSSI et al., 2013; TOWNSEND et al., 2014).

Durante o desenvolvimento de um fármaco, várias são as circunstâncias que podem causar a degradação dos princípios ativos da formulação. A luz é um dos fatores que contribuem para desencadear reações de degradação, como é o caso da oxidação (MIRCO, 2007). O processo oxidativo afeta várias substâncias, como os alcaloides e envolve a presença de radicais livres, os quais contribuem para o aceleração da oxidação e dessa forma a deterioração da substância manipulada (POMBAL, 2010) e sugerindo a existência de reação de oxidação pelo alcaloide com a exposição aos raios solares

A densidade da formulação tópica está apresentada na tabela 4, observa-se que mesmo em situações de estresse os produtos ficaram dentro do limite de normalidade estipulado pela literatura que varia de 0,95 – 1,05 g/cm³ (SIQUEIRA et al. 2019).

Tabela 4 - Densidade da formulação tópica em diferentes condições de acondicionamento.

	Densidade da formulação tópica			
	Estufa	Freezer	Ao abrigo da luz solar	Exposição direta à luz solar
24 horas	1	0,97	0,99	1
15 dias	0,97	0,98	0,96	0,98
30 dias	0,95	0,95	0,97	0,94

Fonte: Dados da pesquisa, 2021, Maceió – AL.

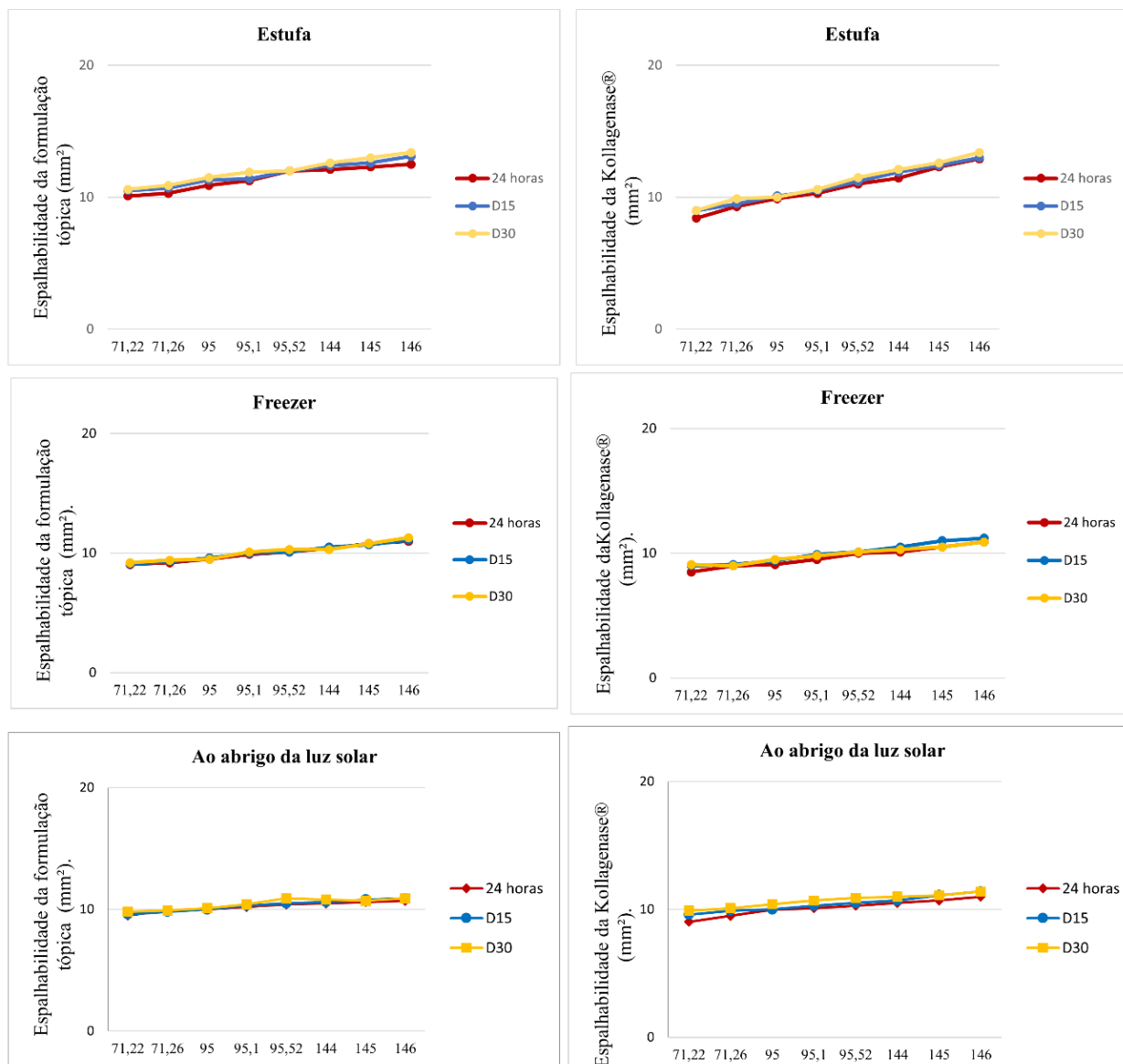
Considerando que a cobertura submetida à radiação solar sofreu alterações nas características organolépticas, no pH e densidade, a mesma não foi selecionada para seguir no ensaio de espalhabilidade, uma vez que essas alterações indicam comprometimento do produto desenvolvido.

Quanto ao ensaio de espalhabilidade e viscosidade, houve comparação com a cobertura Kollagenase®, uma formulação semissólida comercialmente vendida para o tratamento cicatrizante de lesões crônicas que necessitam de desbridamento químico.

Ao ensaio de espalhabilidade (figura 23), o creme à base de berberina apresentou uma estabilidade consistente à medida que o peso foi ampliado nas condições de estufa, freezer e ao abrigo de luz durante os períodos de avaliação, sendo viável para utilização de tratamento tópico em lesões cutâneas, já que este resultado indica uma facilidade de

aplicação no leito da lesão e retenção no sítio de aplicação mesmo recebendo pressão de coberturas secundárias para oclusão da ferida.

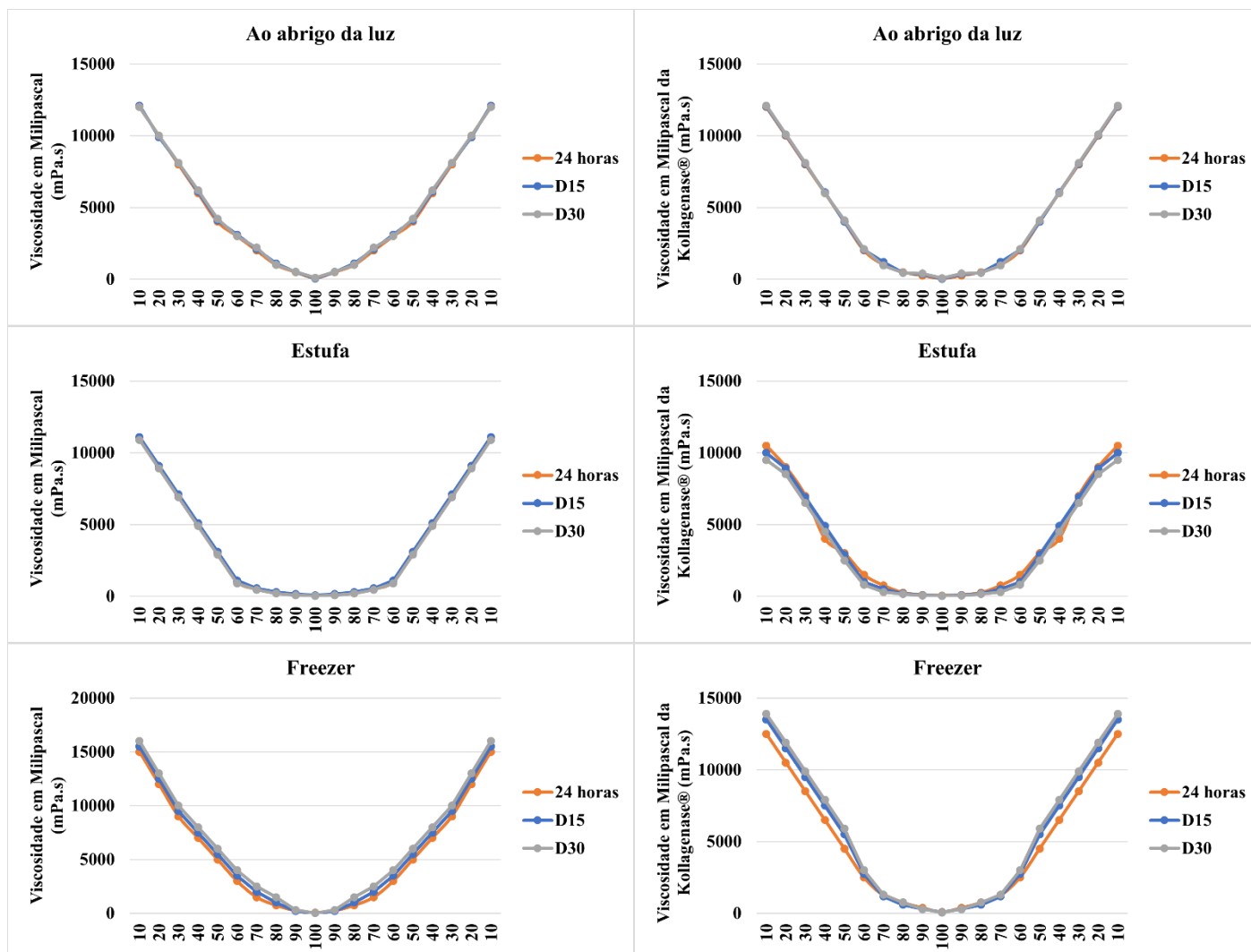
Figura 22 – Ensaio de espalhabilidade da formulação tópica em comparação a formulação comercialmente vendida em diferentes condições de acondicionamento avaliado com 24 horas, 15 e 30 dias.



Fonte: Dados da pesquisa, 2021, Maceió – AL.

Ao ensaio de viscosidade (figura 24), que se trata do estudo quanto a fluidez e deformação de matéria influenciados por forças externas foi possível determinar a reologia da cobertura desenvolvida. Este ensaio é relevante devido a necessidade das formulações tópicas apresentarem consistência e suavidade aceitáveis pelos consumidores (PEREIRA, 2005).

Figura 23 - Viscosidade do creme à base de berberina em função da velocidade de rotação em comparação a cobertura Kollagenase®



Fonte: Dados da pesquisa, 2021, Maceió-AL.

O bioproduto desenvolvido no presente estudo é classificado como um fluido não-newtoniano, por não seguir a lei de Newton de fluidos viscosos, uma vez que não mostra proporcionalidade direta entre força e gradiente de velocidade. Os fluidos newtonianos possuem viscosidade absoluta constante independente da variação da taxa de deformação (SORIANO et al., 1996; SCHRAMM, 2006).

No creme à base de berberina, a viscosidade variou em função do gradiente de velocidade de rotação e manteve estabilidade de acordo com as condições de

acondicionamento, além de exibir um comportamento similar em comparação a viscosidade da cobertura Kollagenase®.

De acordo com Schramm (2006), isto acontece porque vários fluidos aparentam homogeneidade, mas são constituídos por distintas partículas que em repouso apresentam uma organização que lhes dá característica de alta viscosidade, mas que com o aumento da tensão de cisalhamento, essas partículas apresentam organizações de estiramento, deformação no sentido do fluxo ou pode ocorrer a quebra das partículas que refletem no escoamento com maior facilidade do produto.

A produção de uma cobertura em creme à base do alcaloide Berberina, que se mostra capaz de inibir a glicação de produtos avançados, reduzir os níveis de citocinas responsáveis por reações inflamatórias que prolongam o processo de cicatrização, promover a proliferação de macrófagos e com pH ácido que pode modular o meio alcalino da lesão, surge como uma alternativa positiva para melhorar a condição clínica de pessoas acometidas por lesões crônicas de pele.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo conseguiu alcançar os objetivos propostos e o desenvolvimento de formulação tópica para cicatrização de feridas foi efetivado.

Para viabilidade celular, o alcaloide berberina se mostrou capaz de manter células viáveis e na menor concentração da substância foi capaz de aumentar o percentual dos macrófagos J774, sugerindo uma capacidade de proliferação celular.

A atividade antibacteriana da berberina foi avaliada por meio do método de microdiluição. O alcaloide apresentou melhor ação antibacteriana frente à estirpe *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella flexneri*, pertencentes ao grupo das Gram negativas, com uma CIM de 62,5 µg/ml. Quando testado frente à microrganismos pertencentes ao grupo das Gram positivas, a berberina foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* com uma CIM de 125 µg/ml.

Quanto ao ensaio anti-inflamatório, a berberina conseguiu reduzir os níveis de nitritos em 95,20% na concentração de 500µg/mL; ao reduzir pela metade essa concentração (250µg/mL), o percentual aumentou para 95,40% e com a menor concentração (125µg/mL) do alcaloide utilizado, foi observado a redução de 93,16% dos níveis de nitritos dos macrófagos tratados.

Ao avaliar a produção de TNF α pelos macrófagos ativados por LPS+IFN- γ , verificou-se que as 3 concentrações de berberina promoveram uma diminuição que variou de 44,29% - 49,13% com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) ao comparar com o controle negativo.

Na produção de IL-1 β , a berberina reduziu de forma significativa os níveis de IL-1 β ($p < 0,001$) quando comparadas ao controle negativo e controle positivo. A redução variou de 18,18% - 27,27%, exibindo percentuais menores que o do controle positivo para as 3 concentrações testadas.

Quanto a produção de PGE-2, a berberina apresentou uma redução que variou de 40,44% - 43,57%, valores estes que não apresentaram diferença significativa em comparação a redução com o tratamento feito por dexametasona (50,45%) ($p > 0,05$).

O alcaloide berberina apresentou inibição adequada de produtos avançados da glicação durante os 4 períodos de avaliação do ensaio antiglicante, resultado este que fortalece a sua capacidade de atuar de forma efetiva no processo de cicatrização de lesões cutâneas.

A formulação tópica desenvolvida apresentou-se estável ao longo dos ensaios de centrifugação, estresse térmico, ciclo gela-desgela no processo de estabilidade preliminar e não foram observadas alterações nas suas características organolépticas.

Ao ensaio de estabilidade acelerada, apenas a formulação submetida a luz solar direta apresentou instabilidade nas características organolépticas, pH e espalhabilidade, concluindo que este tipo de acondicionamento não deve ser utilizado para a formulação.

Diante dos resultados obtidos e considerando as atividades biológicas exibidas pelo alcaloide berberina, a formulação tópica desenvolvida no presente estudo mostra-se promissora para ser utilizada como cobertura no tratamento de lesões cutâneas crônicas.

Como novas perspectivas, espera-se desenvolver outras formulações adequadas para atuar no processo de cicatrização, como as membranas bioativas e realizar ensaios clínicos para confirmar estas atividades em sistemas biológicos mais complexos.

REFERÊNCIAS

AAWC - Association for the Advancement of Wound Care. Advancing Your Practice: Understanding Wound Infection and the Role of Biofilms. In: THOMAS, J.G. **Wound microbiology**, 2008.

Abd El-Wahab, AE, Ghareeb, DA, Sarhan, EE, Abu-Serie, MM, e El Demellawy, MA (2013). Avaliação biológica in vitro de Berberis vulgaris e do seu constituinte ativo, berberina: antioxidantes, efeitos anti-acetilcolinesterase, antidiabéticos e anticancerígenos. *Medicina complementar e alternativa BMC* , 13 , 218.

AGRA, M. D. F., SILVA, K. N., BASÍLIO, I. J. L. D., FREITAS, P. F. D., & BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.18, p. 472-508, 2008

Ahmed N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005;67(1):3-21.

ALVES, D.F.S., CABRAL-JÚNIOR, F.C., CABRAL, P.P.A.C., OLIVEIRA-JÚNIOR, R.M., REGO, A.C.M., MEDEIROS, A.C. Efeitos da Aplicação Tópica do Mel de Melipona Subnitida. **Rev. Col. Bras. Ci.** v. 35, n. 3, 2008

ALVIM, N. A. T., DE ASSUNÇÃO FERREIRA, M., CABRAL, I. E., DE ALMEIDA FILHO, A. J. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Rev. Latino-am Enfermagem.** v.14, n.3, 2008.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica, Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos.** 6. Ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. P. 132 – 150, 286 – 291, 397 – 438.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos. Módulo IV. Brasília: ANVISA, 2004

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. -- 1. ed. -- Brasília: ANVISA, 2004. 52 p.

ARAÚJO M. G. S., SILVA A. L. L., SILVA-JUNIOR E. F., SANTOS JUNIOR P. F. S., SANTOS M. S., BERNARDO T. H. L., BASTOS M. L. A., ALEXANDRE-MOREIRA M. S., ARAÚJO-JÚNIOR J. X. VERÍSSIMO R. C. S. S. Evaluation of

antimicrobial and cytotoxic potential of *Argemone mexicana* L. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 7(12):482-489, 2015.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2° ed., Porto Alegre: Artemd, 677p, 2005.

BAE, YOUNG-AN; CHEON, HYAE GYEONG. Activating transcription factor-3 induction is involved in the anti-inflammatory action of berberine in RAW264. 7 murine macrophages. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 20, n. 4, p. 415-424, 2016.

BANDYOPADHYAY, S., PATRA, P. H., MAHANTI, A., MONDAL, D. K., DANDAPAT, P., BANDYOPADHYAY, S., SARKAR, M. Potential antibacterial activity of berberine against multi drug resistant enterovirulent *Escherichia coli* isolated from yaks (*Poephagus grunniens*) with haemorrhagic diarrhoea. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 6, n. 4, p. 315-319, 2013.

BAPTISTA, P. C. P., FELLI, V. E. A., MININEL, V. A., KARINO, M. E., SILVA, S. M., TITO, R. S., SARQUIS, L. M. M. A inovação tecnológica como ferramenta para monitoramento da saúde dos trabalhadores de enfermagem. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 45, n. spe, p. 1621-1626, 2011.

BARSOTTI, Maria Chiara et al. Effect of Platelet Lysate on Human Cells Involved in Different Phases of Wound Healing. *PloS one*, v. 8, n. 12, 2013.

BASTOS, M.L.A.et. al. Atividade antimicrobiana in vitro dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Zeyheria tuberculosa*. *Rev. Rene*. v.13, n.5, p.1015-24. 2012.

BHARDWAJ M, SUREKHA, DUHAN JS. Free radical-scavenging and antimutagenic potential of acetone, chloroform and methanol extracts of leaf of *Argemone mexicana*, *Int J Pharm Biosci* 2:455-464, 2011.

BIESKI IGC, et al. Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). *Evi-Based Compl. Alt.* p. 1-36, 2012

Bjarnsholt T, Kirketerp-Moller K, Jensen PO, Madsen KG, Phipps R, Krogfelt K, et al. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen.* 2008; 16(1): 2-10.

BLASKO, G.; CORDELL, G. A.; BHAMARAPRAVATI, S.; BEECHER, C. W. W. Carbon-13 NMR assignments of berberine and sanguinarine. **Heterocycles**, 27, 911–916, 1988.

BOND EF, HEITKEMPER MM. Physiological nursing science: emerging directions. **Res Nurs Health**. Oct; 24(5):345-8, 2001

BORGES EL, et al. Feridas: como tratar. 2ª edição. Belo Horizonte: Coopmed; 2008
Borges et al. Feridas: como tratar. Belo Horizonte: Coopmed, 2008. 248 p.

BRAHMACHARI, Goutam; GORAI, Dilip; ROY, Rajiv. Argemone mexicana: chemical and pharmacological aspects. *Rev. bras. farmacogn. Curitiba*, v. 23, n. 3, 2013.

BRANCO-NETO MLC, et al. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cir. Bras.** v.2, p. 15-20, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública n. 43, de 7 de julho de 2004. Determina a publicação do Guia para a realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 7 de julho de 2004.

BRYANT RA, DENISE PN, EDITORS. **Acute & chronic wounds: current**

CAMPOS AC, GROTH AK, BRANCO AB. Assessment and nutritional aspects of wound healing. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab.** Care v.11, p. 281-288, 2008.

CATÃO RMR et. al. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus**. **RBAC**. V. 42, n. 1, p. 9-14, 2010.

CHANG YC, CHANG FR, KHALIL AT, HSIEH PW, WU YC Cytotoxic benzophenanthridine and benzylisoquinoline alkaloids from *Argemone mexicana*. **Z Naturforsch** 58c: 521-526, 2003.

Chen, SA, Chen, HM, Yao, YD. Topical treatment with anti-oxidants and Au nanoparticles promote healing of diabetic wound through receptor for advanced glycation end-products. *Eur J Pharm Sci* 2012; 47: 875–883.

CHOI, S. B., BAE, G. S., JO, I. J., WANG, S., SONG, H. J., & PARK, S. J. Berberine inhibits inflammatory mediators and attenuates acute pancreatitis through deactivation of JNK signaling pathways. **Molecular immunology**, v. 74, p. 27-38, 2016.

CHOPRA RN, NAYAR SL, CHOPRA IC. **Glossário de plantas medicinais indianas**. Nova Deli: NISCOM, CSIR, p. 23, 1956.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Documents M2-A8 e M7-A6, M100- S15, Vol. 25 No. 1, Pennsylvania - USA, 2005.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-Second. Documents. M100-S22. v.32, n.3. 2012.

CORDELL, Geoffrey A.; QUINN-BEATTIE, Mary Lou; FARNSWORTH, Norman R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 183-205, 2001.

CRISTINA SAMPAIO, W.; ALCÂNTARA NERES DE CARVALHO, L.; LEMOS BRETTAS CARNEIRO, M. AVANÇOS NO DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS VISANDO TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS. **Hegemonia: Revista de Ciências Sociais**, n. 25, p. 35, 11.

Dabiri, G., Damstetter, E., & Phillips, T. (2016). Escolha de um curativo com base nas características comuns da ferida. *Avanços no tratamento de feridas*, 5 (1), 32-41. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0586>

DAS PK, Sethi R, Panda P, Pani SR 2009. Hepatoprotective activity of plant *Argemone mexicana* (Linn) against carbon tetrachloride (CCl₄) induced hepatotoxicity in rats. **Int J Pharm Res Dev** 8:1-20.

DASH GK, MURTHY PN. Evaluation of *Argemone mexicana* Linn. leaves for wound healing activity, **J Nat Prod Plant Resour** 1:46-56, 2011.

DEALEY, Carol. **The care of wounds: A guide for nurses**. 3 ed. John Wiley & Sons, 2005.

DEGANI ALG.; CASS, QB.; VIEIRA, PC. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 7, 2011.

DOS SANTOS, Wanderlei Barbosa et al. Microbiota infectante de feridas cirúrgicas: análise da produção científica nacional e internacional. **Revista SOBECC**, v. 21, n. 1, p. 46-51, 2016.

Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis*. 2004; 17(2): 91-6.

Falanga V, Lindholm C, Carson PA, Panuncialman J, et al. . Texto Atlas of Wound Managment, 2ª ed . Londres, Reino Unido: Informa Healthcare, 2012.

FALANGA V. Growth factors and wound healing. **J Dermatol Surg Oncol**. 1993;19:711-4.

FERREIRA, A. O. Guia Prático da farmácia Magistral. Boas Práticas de Manipulação. Juiz de Fora., P. 159 – 197, 2002.

GACCHE RN, SHAIKH RU, PUND MM. *In vitro* evaluation of anticancer and antimicrobial activity of selected medicinal plants from Ayurveda. **Asian J Trad Med** 6:127-133, 2011.

GALI K, RAMAKRISHNAN G, KOTHAI R, JAYKAR B. *In-vitro* anti-cancer activity of methanolic extract of leaves of *Argemone mexicana* Linn. **Int J PharmTech Res** 3:1329-1333, 2011.

GARROS IC, et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cir. Bras**. v. 21, n. 3, p.55-65, 2006.

GETHIN, Georgina T.; COWMAN, Seamus; CONROY, Ronan M. The impact of Manuka honey dressings on the surface pH of chronic wounds. *International Wound Journal*, v. 5, n. 2, p. 185-194, 2008.

GHOSH T, DASH GK, BOSE A, PANDA BR. Wound healing properties of *Argemone mexicana*. **Indian J Nat Prod** 20:3-6, 2005.

Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010 Oct 29;107(9):1058-70. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545. PMID: 21030723; PMCID: PMC2996922.

GOBATO, R; FEDRIGO, DFG; GOBATO, Aleksander. Molecular geometry of alkaloids present in seeds of mexican prickly poppy, 2015.

GOSAIN A, DIPIETRO LA. Aging and wound healing. **World J. Surg.** v. 28, p. 321-326, 2004.

Graves, DT, Liu, R, Alikhani, M. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis—impact on periodontal pathology. **J Dent Res** 2006; 85: 15–21.

GU, M., XU, J., HAN, C., KANG, Y., LIU, T., HE, Y., LIU, C. Effects of berberine on cell cycle, DNA, reactive oxygen species, and apoptosis in L929 murine fibroblast cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

GUO, S; DIPIETRO, LA. Factors affecting wound healing. **Journal of dental research.** v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.

HOLTZCLAW BJ, HANNEMAN SK. Use of non-human biobehavioral models in critical care nursing research. **Crit. Care Nurs.** Feb; 24(4):30-4, 2002.

HUSSEIN, ADEL J., et al. Effects of a low level laser on the acceleration of wound healing in rabbits. **North American journal of medical sciences.** v. 3, n. 4, p. 193-197, 2011.

IBRAHIM HA, IBRAHIM H. Phytochemical screening and toxicity evaluation on the leaves of *Argemone mexicana* Linn. (Papaveraceae). **Int. Jor. App. Sci.** v. 3, p.39-43, 2009

IMANSHAHIDI, Mohsen; HOSSEINZADEH, Hossein. Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. **Phytotherapy research**, v. 22, n. 8, p. 999-1012, 2008.

JAIN RA, AGARWAL RC, DUBEY D, VERMA R, JAIN R. Evaluation of antibacterial and antioxidant activity of fruits extract of *Argemone mexicana* Linn. **Int J Pharm innov** 2:45-51, 2012.

JALIWALA YA, PANDA PK, CHOURASIA N, BHATT NK, PANDIT A, MOHANTY PK. *In vitro* anthelmintic activity of aerial parts of *Argemone mexicana* Linn. *J Pharm Res* 4:3173-3174, 2011.

JOHNSON, S. Five steps to successful wound healing in the community. **Wound care**, v. 29, n. 4, p. 30-39, 2015.

JOSHI, N. U. P. U. R., BHATT, S. H. A. S. H. A. N. K., DHYANI, S., & NAIN, J. Y. O. T. I. Phytochemical screening of secondary metabolites of *Argemone mexicana* linn. flowers. **Int J Curr Pharm Res**, v. 5, n. 2, p. 144-147, 2013.

KANG, S., LI, Z., YIN, Z., JIA, R., SONG, X., LI, L., LAI, X. The antibacterial mechanism of berberine against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Natural product research**, v. 29, n. 23, p. 2203-2206, 2015.

KHALIL, H., CULLEN, M., CHAMBERS, H., CARROLL, M., WALKER, J. Elements affecting wound healing time: an evidence based analysis. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 4, p. 550-556, 2015

KOEHLER, Julia et al. pH-Modulating Poly (ethylene glycol)/Alginate Hydrogel Dressings for the Treatment of Chronic Wounds. *Macromolecular bioscience*, v. 17, n. 5, p. 1-11, 2017.

KROYMANN, Juergen. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. **Current opinion in plant biology**, v. 14, n. 3, p. 246-251, 2011.

KUMARI, RANJEETA; PATTANAIK, ASHOK KUMAR; THAKUR, ABHIMANYU. Evaluation of wound healing activity of the active fraction of stem extract of *Argemone mexicana*. **Der Pharmacia Lettre**, 7 (11):107-119, 2015.

L. Meng, X. Guo, X. Yang, H. Liu, M. Yu, Y. Wu, Z. Zhu, Human α defensins promote the expression of the inflammatory cytokine interleukin-8 under high-glucose conditions: Novel insights into the poor healing of diabetic foot ulcers, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 33 (2019).

LAUREANO A, RODRIGUES AM. Cicatrização de feridas. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**. v. 69, n. 3, p. 355, 2011.

LORENZETTI, J. et al. Tecnologia, inovação tecnológica e saúde: uma reflexão necessária. **Texto and Contexto Enfermagem**, v. 21, n. 2, p. 432, 2012.

MAILLARD, LC . Formation of melanoidins in a methodical way. *Compt Rend* 1912; 154: 66.

MAJEED A, TAJU G, NATHIGA NAMBI KS, MENAKA H.. Anthelmintic activity of *Argemone mexicana* leaves extract against *Pheretima prosthuma* and *Ascaridia galli*. **Res J Pharm Biol Chem Sci** 2:773-777, 2011.

Management concepts. Oxford: elsevier health sciences, 2012.

MANDELBAUM, S.H., DI SANTI,E.P.,MANDELBAUM, M.H.S.A. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources –Part I *Anais Brasileiro de Dermatologia*, 72; 393-410;2013.

MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Ed. da UFC, Fortaleza, Ceará, 148p. 2009

MENDHAM, J; DENNEY, RC; BARNES, JC; THOMAS, MJK. **VOGEL, Análise Química Quantitativa**. 6ª ed., LTC – Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 2002.

MENDONÇA RJ, COUTINHO-NETTO J. Aspectos celulares da cicatrização. **Na. Bras. Dermatol.** v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.

Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. *Clin Dermatol*. 2007; 25(1): 19-25.

MEXICANA L. **Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 1073-1076, 2013.

MIRANDA, SM et. al. Ethical issues in qualitative nursing research: a reflective approach/Aspectos éticos em pesquisas qualitativas da enfermagem: uma abordagem reflexiva. **Revista de Enfermagem da UFPI**, v. 2, n. 4, p. 92-6, 2014.

MONTAGNER D & CORRÊIA GM. Avaliação da estabilidade de cremes com uréia em diferentes pHs. **Rev. Bras. Farm.** v.85 (3): p.69-72, 2004.

MORAIS GFC, OLIVEIRA SHS, SOARES MJGO. Avaliação de feridas pelos enfermeiros de instituições hospitalares da rede pública. **Texto & Contexto-Enfermagem**; v. 17, n.1, p. 98-105, 2008.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **J. Immunol. Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

NAIKA, H. Raja; KRISHNA, V. Micropropagation, isolation and characterization of Berberine from leaves of *Naravelia zeylanica* (L.) DC. **Res J Med Plant**, v. 2, p. 1-9, 2008.

NARDINI, Marta et al. Growth Factors Delivery System for Skin Regeneration: An Advanced Wound Dressing. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 120, 2020.

NAYAK P, KAR DM, MAHARANA L. Antidiabetic activity of aerial parts of *Argemone mexicana* L. in alloxan induced hyperglycaemic rats. **Pharmacologyonline** 1:889-903, 2011.

NORMA F, et al. *Staphylococcus* coagulasa-negativa clinicamente significativos: Especies más frecuentes y factores de virulencia. **Rev. chil. infectol.** v. 30, n. 5, p. 480-8, 2013.

NWOMEH BC, YAGER DR. Physiology of the chronic wound. **Clin Plast Surg**, 25:341-56. 1998.

PANDEY A, KARANWAL V. A study of extract optimization and effect of metal ions on antibacterial properties of *Argemone mexicana*. **Asian J Plant Sci Res** 1:43-48, 2011.

P. Yang, J. Feng, Q. Peng, X. Liu, Z. Fan, Advanced Glycation End Products: Potential Mechanism and Therapeutic Target in Cardiovascular Complications under Diabetes, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019 (2019).

PARENTE, L.M.L. et al . Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 11, n. 4, 2009.

Q. Wang, X. Cao, G. Zhu, T. Xie, K. Ge, Y. Niu, Blockade of receptor for advanced glycation end products improved essential response of inflammation in diabetic wound healing, *Int. J. Diabetes Dev. Ctries.* (2019) 1–7.

QUEIROZ, M. B. R. Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de *Matricaria recutita* (L) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica comparada com gel de diclofenaco sódico. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Brasília, DF, 2008.

RAHMAN MM, ALAM MJ, SHARMIN SA, RAHMAN MM, RAHMAN A, ALAM MF. *In vitro* antibacterial activity of *Argemone mexicana* L (Papaveraceae). *CMU J Nat Sci* 8:77-84, 2009.

RAMASASTRY SS. Acute wounds. *Clin Plast Surg*. 2005;32(2):195-208.

ROSAS-PINON Y, MEJIA A, DIAZ-RUIZ G, AGUILARA MI, SANCHEZ-NIETOC S, RIVERO-CRUZA JF. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *J Ethnopharmacol* 141:860-865, 2012.

ROSSI, G. O.; CABRAL, D. B.; SHIMURA, C. M. N. et al. Sacarose em feridas infectadas: fundamentação científica e especulações. *Revista Rene*. v. 14, No 5, p. 1022-1030, 2013.

ROUT SP, KAR DM AND MANDAL PK. Hypoglycaemic activity of aerial parts of *Argemone mexicana* L. in experimental rat models. **Int J Pharm Pharmaceut Sci** 3:533-540, 2011.

Rutter, K, Sell, DR, Fraser, N. Green tea extract suppresses the age-related increase in collagen crosslinking and fluorescent products in C57BL/6 mice. **Int J Vitam Nutr Res** 2003; 73: 453–460.

SAKTHIVADIVEL M, EAPEN A, DASH AP. Evaluation of toxicity of plant extracts against vector of lymphatic filariasis, *Culex quinquefasciatus*. **Indian J Med Res** 135:397-400, 2012.

SAKTHIVADIVEL M, THILAGAVATHY D. Larvicidal and chemosterilant activity of the acetone fraction of petroleum ether extract from *Argemone mexicana* L. seed. **Biores Technol** 89:213-216, 2003.

SAMAL, Pradeep Kumar. HPTLC ANALYSIS OF BERBERINE IN ARGEMONE SAMPAIO, Waneli Cristina; DE CARVALHO, Luna Alcântara Neres; CARNEIRO, Marcela Lemos Brettas. AVANÇOS NO DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS VISANDO TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS. **Hegemonia: Revista de Ciências Sociais**, n. 25, p. 35-35, 2018.

SANTOS V ET al V. Abordagem de feridas estagnadas: estimular a epitelização. *Journal of aging and innovation*. Volume 1, Edição 4 - 2012.

SARANYA MS, ARUN T, IYAPPAN P. *In vitro* antibacterial activity and preliminary phytochemical analysis of leaf extracts of *Argemone mexicana* L. - A medicinal plant. *Int J Curr Pharm Res* 4:85-87, 2012.

SARMENTO, PA et. al. Evaluation of the extract of *Zeyheria tuberculosa* with a view to products for wound healing. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 22, n. 1, p. 165-172, 2014

SAVITHRAMMA N, SULOCHANA CH, RAO KN. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas para tratar a asma em Andhra Pradesh, na Índia. *J. Ethnopharmacol* v. 113, p. 54-61, 2007.

SCHULTZ GS, et al. Wound bed preparations: a systematic approach to wound management. *Wound Rep. Reg.* v.11, n. 1, p. 1-28, 2011.

SHARMA J. et. al. The treatment of jaundice with medicinal plants in indigenous communities of the Sub-Himalayan region of Uttarakhand, India. *J. Ethnopharmacol.* v.143, p. 262-91, 2012.

SHARMA S, SHARMA MC, KOHLI, DV. Pharmacological screening effect of ethanolic and methanolic extract of fruits of medicinally leaves. *Dig J Nanomat Biostr* 5:229-232, 2010.

SILVA et. al. *Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem*, 2 ed. São Paulo: Yendis, 2007.

SILVERSTAIN, R.M; WEBSTER, F.X. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro: LTC; 2000.

SINGH, S., SINGH, A., JAISWAL, J., SINGH, T. D., SINGH, V. P., PANDEY, V. B., SINGH, U. P. Antifungal activity of the mixture of quaternary alkaloids isolated from *Argemone mexicana* against some phytopathogenic fungi. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 43, n. 8, p. 769-774, 2010.

SINGH, Sarita et al. A new benzyloquinoline alkaloid from *Argemone mexicana*. **Natural product research**, v. 24, n. 1, p. 63-67, 2010.

SINGH, Sarita et al. Cytotoxicity of alkaloids isolated from *Argemone mexicana* on SW480 human colon cancer cell line. *Pharmaceutical biology*, v. 54, n. 4, p. 740-745, 2016.

SINGH, Sarita et al. Quaternary alkaloids of *Argemone mexicana*. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 2, p. 158-160, 2010

SINGH, Sarita; PANDEY, Vidya Bhushan; SINGH, Tryambak Deo. Alkaloids and flavonoids of *Argemone mexicana*. **Natural product research**, v. 26, n. 1, p. 16-21, 2012.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman (SBQ), pp. 271-2, 2002

SOURABIE TS, OUEDRAOGO N, SAWADOGO WR, YOUGBARE N, NIKIEMA JB, GUISSOU IP, NACOULMA OG. Evaluation of the anti-icterus effect of crude powdered leaf of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae) against CCl₄-induced liver injury in rats. *Int J Pharm Sci Res* 3:491-496, 2012.

SPATUZZA C, POSTIGLIONE L, COVELLI B, RICCIARDONE M, BENVENUTI C, MONDOLA P, BELFIORE A. Effects of berberine and red yeast on proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of human subjects. **Front Pharmacol.**, 20;5:230, 2014.

SPERANÇA, P.A., GOMES, A.S., PRAZERES, C.M.G. Sensibilidade dos *S. aureus* aos betalactâmicos e glicopeptídeos ("Estudo in vitro"). **Rev. cir. traumatol. buco-maxilo-fac**, Camaragibe, v.10 n. 4. 2010.

SUKUMAR D, NAMBI RA, SULOCHANA N. Studies on the leaves of *Agremone mexicana*. *Fitoterapia* 55:325-353, 1984.

TAMER, M. Tamer et al. Enhancement of wound healing by chitosan/hyaluronan polyelectrolyte membrane loaded with glutathione: In vitro and in vivo evaluations. **Journal of Biotechnology**, 2020.

TAZIMA MFGS, VICENTE YAMVA, MORIYA T. Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 41(3): 259-64, 2008.

TILLHON, M., ORTIZ, L. M. G., LOMBARDI, P., & SCOVASSI, A. I. Berberine: new perspectives for old remedies. **Biochemical pharmacology**, v. 84, n. 10, p. 1260-1267, 2012.

TOWNSEND, C. R.; BEAUCHAMP, D.B; EVERS, M.; MATTOX, K. L. Tratado de cirurgia: A base biológica da Prática Cirúrgica Moderna. 19º ed. Elsevier Brasil, 2014.

TRABULSI LR, ALTERTHUM F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu. 2006; 718.

TURNER, Keith H. et al. Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* Acute Burn and Chronic Surgical Wound Infection. **PLoS genetics**, v. 10, n. 7, 2014.

TUROLLA, M.S.R., NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 42, n. 2, Abr-Jun, 2009.

VELNAR T; BAILEY T; SMRKOLJ J. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. **The Journal of International Medical Research**. v. 37, p.1528 – 1542, 2009.

WANG, Xiaoqing et al. Berberine inhibits *Staphylococcus epidermidis* adhesion and biofilm formation on the surface of titanium alloy. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 11, p. 1487-1492, 2009b.

WANG, Xiaoqing et al. Effect of berberine on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. **International journal of antimicrobial agents**, v. 34, n. 1, p. 60-66, 2009a.

Watters C, DeLeon K, Trivedi U, Griswold JA, Lyte M, Hampel KJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms perturb wound resolution and antibiotic tolerance in diabetic mice. *Med Microbiol Immunol*. 2013; 202(2): 131-41.

WEN, S. Q., JEYAKKUMAR, P., AVULA, S. R., ZHANG, L., ZHOU, C. H. Discovery of novel berberine imidazoles as safe antimicrobial agents by down regulating ROS generation. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 26, n. 12, p. 2768-2773, 2016.

WILLCOX ML, GRAZ B, FALQUET J. Argemone mexicana decoction for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. *T Roy Soc Trop Med Hyg* 101:1190-1198, 2007.

WUWHS. Wound Infection in Clinical Practice: a consensus document. MEP, London, 2008.

YADAVA, Raj N.; SHARMA, Jay D.; YADAV, Anurekha. New Constituent from *Argemone mexicana* Linn. **Asian Journal of Chemistry**, v. 26, n. 2, p. 472, 2014.

YAMADA GONZÁLES CVS, Yamada BFA. Barreira da pele: um manto protetor. In: Yamada BFA *Pele: o manto protetor – higiene e hidratação*. São Paulo: editora Andreoli, 2015. Cap. 2, p.49, Parte I – Fundamentos sobre a pele.

ZHAO, W., GE, H., LIU, K., CHEN, X., ZHANG, J., & LIU, B. Nandinine, a Derivative of Berberine, Inhibits Inflammation and Reduces Insulin Resistance in Adipocytes via Regulation of AMP-Kinase Activity. **Planta Medica**, 2016.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001;414:782-7.