

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
CAMPUS ITAQUERA**

JULIANA BEZERRA MACEDO

**MEMBRANAS A BASE DE QUITOSANA COM DIFERENTES MASSAS
MOLARES: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E BIOATIVIDADE**

**CHITOSAN-BASED MEMBRANES WITH DIFFERENT MOLAR
MASSES: PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND BIOACTIVITY**

São Paulo – SP

2023

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

JULIANA BEZERRA MACEDO

MEMBRANAS A BASE DE QUITOSANA COM DIFERENTES MASSAS MOLARES: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E BIOATIVIDADE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Prof(a). Dr(a). Adriana Pavinatto
Orientador(a)

Prof. Dr(a). Lívia Assis
Coorientador(a)

São Paulo – SP
2023

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).**

M122m MACEDO, Juliana Bezerra.

Membrana à base de Quitosana com diferentes massas molares: produção, caracterização e bioatividade / Juliana Bezerra Macedo -- São Paulo: Universidade Brasil, 2023.

78 f. il. color.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Profa. Dra. Adriana Pavinatto.

Coorientação: Profa. Dra. Livia Assis.

1. Quitosana. 2. Massa molar. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Fibroblastos. 5. Reparo tecidual. I. Pavinatto, Adriana. II. Assis, Livia. III. Título.

CDD 610.28

TERMO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE
BRASIL
CAMPUS SÃO PAULO

TERMO DE APROVAÇÃO

JULIANA BEZERRA MACEDO

“MEMBRANAS A BASE DE QUITOSANAS COM DIFERENTES MASSAS
MOLECULARES: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E BIOATIVIDADE”

”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br ADRIANA PAVINATTO DA COSTA
Data: 15/12/2023 07:13:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.ª. Dra. Adriana Pavinatto da Costa (Orientadora/Presidente)

Documento assinado digitalmente
gov.br ANA LAURA MARTINS DE ANDRADE
Data: 15/12/2023 09:34:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.ª. Dra. Ana Laura Martins de Andrade (Membro Interno)

Documento assinado digitalmente
gov.br CARLA ROBERTA TIM
Data: 15/12/2023 11:06:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.ª. Dra. Carla Roberta Tim (Membro Interno)

Documento assinado digitalmente
gov.br RAFAELA CRISTINA SANFELICE
Data: 15/12/2023 11:20:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rafaela Cristina Sanfelice (Membro Externo)

Documento assinado digitalmente
gov.br SAMUEL GUERRA TORRES
Data: 15/12/2023 11:13:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Samuel Guerra Torres (Membro Externo)

São Paulo, 14 de dezembro de 2023.

Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Adriana Pavinatto da Costa

Houve alteração do Título: sim (X) não ():
Membranas a base de quitosana com diferentes massas molares: produção, caracterização
e bioatividade _____

[Digite aqui]

Rua Carolina Fonseca, 584 – Itaquera – São Paulo –
CEP: 08230-030

FICHA DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DO TEXTO NA PÁGINA UNIVERSIDADE BRASIL E CATÁLOGO DE TESES E DISSERTAÇÕES DA CAPES E REPRODUÇÃO DO TRABALHO



UNIVERSIDADE
BRASIL
CAMPUS SÃO PAULO

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWWdo Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(am) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

TÍTULO DO TRABALHO: “MEMBRANAS A BASE DE QUITOSANAS COM DIFERENTES MASSAS MOLECULARES: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E BIOATIVIDADE”

Autor(es):

Discente: **Juliana Bezerra Macedo**
Assinatura: _____



Documento assinado digitalmente
JULIANA BEZERRA MACEDO
Data: 15/12/2023 12:14:18-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Adriana Pavinatto da Costa**

Assinatura: _____



Documento assinado digitalmente
ADRIANA PAVINATTO DA COSTA
Data: 15/12/2023 07:13:55-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Coorientador(a):

Assinatura: _____

Houve alteração do Título: sim () não ():

Membranas a base de quitosana com diferentes massas molares: produção, caracterização e bioatividade

DEDICATÓRIA

“Dedico esse trabalho aos meus pais, Hildebrando e Marilene, pelo amor incondicional, por todo incentivo e apoio”.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir tantas realizações. Toda honra, glória e gratidão a tudo que tenho e tudo que sou.

Aos meus pais, Hildebrando Macedo Filho e Marilene de Sousa Bezerra Macedo, por ser o alicerce desta conquista.

Ao meu esposo Claudio Scott Bortoleto, pelo amor e companheirismo nesta e em tantas outras jornadas.

Aos meus irmãos, Glauber Bezerra Macedo e Daniela Bezerra Macedo, pelo apoio, amizade e parceria.

Às minhas sobrinhas, Sueny Lara C. Macedo e Lohane B. M. L. Barros, que simplesmente por existirem tornam meus dias mais leves, mais alegres e me completam.

À minha cunhada Itatiana A. S. Macedo, por adicionar alegria à nossa família.

À Universidade Estadual do Piauí, pelo apoio durante o percurso.

À disposição dos membros da banca examinadora, pelo aceite em contribuir com a avaliação e discussão da tese.

À minha orientadora Adriana Pavinatto, pela oportunidade concedida, ensinamentos, orientação e incentivo.

À minha coorientadora Livia Assis, por todo apoio e parceria nos experimentos.

À CAPES, pelos auxílios fornecidos.

Ao corpo docente e à Universidade Brasil, por me adicionarem conhecimentos que levarei para vida.

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

CORA CORALINA

RESUMO

Quitosana é um polissacarídeo muito utilizado em aplicações biomédicas devido a sua bioatividade, que frequentemente está relacionada e pode ser modulada por suas características estruturais. Dentre essas características, a massa molar é uma das que influencia sua ação e, conforme cita a literatura, pode ter diferente atividade a depender do micro-organismo estudado. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a bioatividade de quatro tipos de membranas formadas por quitosanas de alta (QAMM) e baixa (QBMM) massa molar puras e associadas com cúrcuma (QAMM + cúrcuma e QBMM + cúrcuma), produzidas através da técnica de formação de filmes finos *casting* (evaporação do solvente). Para caracterização físico-química e morfológica das membranas foram utilizadas as técnicas de medidas de espessura, espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) e ângulo de contato. Para realização dos testes microbiológicos, foram utilizados Cepas do fungo *Trychophyton rubrum*, da bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* e da bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, sendo que a bioatividade das membranas foi avaliada através do *halo* de inibição formado. Para a avaliação da viabilidade/citotoxicidade celular foi utilizado células em linhagem de fibroblastos (L929) na concentração de 1×10^4 por meio de ensaio de *AlamarBlue*® e *Picrogreen*. A metodologia empregada para fabricar membranas foi bem sucedida, sendo possível a obtenção de membranas autossustentáveis e homogêneas, com espessura variando entre de 35 a 56 μm . Os espectros FTIR mostram as principais bandas vibracionais para grupos químicos da quitosana. Os resultados de ângulo de contato mostram que as membranas que contém cúrcuma são mais hidrofílicas do que de quitosana pura. As membranas não apresentaram propriedades de inibição de crescimento antimicrobiano frente aos micro-organismos testados. No entanto, foi verificada a presença de halo de inibição sob cultura de bactérias nos testes utilizando as soluções de preparo das membranas, sendo que as soluções de QBMM e QBMM + cúrcuma, apresentaram maior efeito inibitório. As membranas produzidas não apresentaram efeito citotóxico, ao modo que induziram o aumento da proliferação celular. De modo geral, QBMM + cúrcuma propiciou maior proliferação celular em comparação ao observado utilizando as outras membranas. Os resultados do presente estudo sugerem que as membranas produzidas são materiais promissores para aplicação na engenharia tecidual, favorecendo a fabricação e sua utilização de forma otimizada.

Palavras-chave: Quitosana. Massa Molar. Atividade Antimicrobiana. Fibroblastos. Reparo Tecidual.

ABSTRACT

Chitosan is a polysaccharide widely used in biomedical applications due to its bioactivity, which is often related and can be modulated by its structural characteristics. Among these characteristics, molar mass is one that influences its action and, as cited in the literature, it may have different activity depending on the microorganism studied. In this context, this study aimed to evaluate the bioactivity of four types of membranes formed by pure high (QAMM) and low (QBMM) molar mass chitosans associated with turmeric (QAMM + turmeric and QBMM + turmeric), produced using the technique casting thin film formation (solvent evaporation). For physicochemical and morphological characterization of the membranes, thickness measurement techniques, absorption spectroscopy in the infrared region (FTIR) and contact angle were used. To carry out the microbiological tests, strains of the fungus *Trichophyton rubrum*, the gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* and the gram-negative bacterium *Escherichia coli* were used, and the bioactivity of the membranes was evaluated through the inhibition halo formed. To evaluate cell viability/cytotoxicity, fibroblast cell lines (L929) were used at a concentration of 1×10^4 using the alamarBlue® and Picrogreen assay. The methodology used to manufacture membranes was successful, making it possible to obtain self-supporting and homogeneous membranes, with thicknesses ranging from 35 to 56 μm . FTIR spectra show the main vibrational bands for chemical groups in chitosan. Contact angle results show that membranes containing turmeric are more hydrophilic than pure chitosan. The membranes did not show antimicrobial growth inhibition properties against the tested microorganisms. However, the presence of an inhibition halo was verified under bacterial cultures in tests using the membrane preparation solutions, with the QBMM and QBMM + turmeric solutions showing a greater inhibitory effect. The membranes produced did not present a cytotoxic effect, as they induced an increase in cell proliferation. In general, QBMM+ turmeric provided greater cell proliferation compared to that observed using other membranes. The results of the present study suggest that the membranes produced are promising materials for application in tissue engineering, favoring their manufacturing and optimal use.

Keywords: Chitosan. Molar mass. Antimicrobial activity. Fibroblasts. Tissue Repair.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

No presente trabalho, as atividades microbiológica e de reparação tecidual do polímero natural quitosana foram testadas. Sabe-se que a massa molar de tal polímero pode influenciar na sua ação, assim, quatro tipos de membranas formadas por quitosanas de alta e baixa massa molar puras e associadas com cúrcuma, foram produzidas através da técnica casting (evaporação do solvente) de formação de filmes finos. As membranas foram testadas no fungo *Trichophyton rubrum*, nas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e em cultura de células de fibroblastos, visando aplicação no reparo tecidual. Nos testes realizados, as membranas não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos, porém, as soluções formadoras dessas apresentaram potencial antimicrobiano frente a bactérias, sendo que as amostras de quitosana de baixa massa molar e quitosana de baixa massa molar + cúrcuma, apresentaram maior efeito inibitório. As membranas produzidas não foram tóxicas as células, ao modo que favoreceram o aumento do seu crescimento (proliferação). A quitosana de baixa massa molar + cúrcuma levou a uma maior proliferação celular. Desta forma, acredita-se que as membranas de quitosana de baixa massa molar + cúrcuma possuam características importantes que sobressaem as demais membranas produzidas para futuros testes *in vivo*, visando aplicação como curativo de feridas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da estrutura química das unidades repetitivas de quitina e quitosana, (A) GlcN e (B) GlcNAc	22
Figura 2- Estrutura química da curcumina	33
Figura 3- Processo de produção das membranas. a) solução precursora em agitador magnético e b) processo de secagem por evaporação de solvente, em substratos de silicone	43
Figura 4- Equipamento utilizado para caracterização das membranas. Espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier.....	44
Figura 5- Equipamento utilizado para caracterização das membranas. Goniômetro da marca KSV Instruments modelo CAM 200	45
Figura 6- Membranas formadas por a) QBMM, b) QBMM + cúrcuma, c) QAMM e d) QAMM + cúrcuma, secas em temperatura ambiente, com fluxo de ar	50
Figura 7- Espectros de FTIR para a) cúrcuma e para membranas formadas por b) QBMM + cúrcuma, c) QBMM, d) QAMM + cúrcuma e e) QAMM	52
Figura 8- Imagens fotográficas das zonas de inibição nas membranas no fungo <i>T. rubrum</i> , A) QBMM, B) QAMM, C) QBMM + cúrcuma e D) QAMM + cúrcuma	55
Figura 9- Imagens fotográfica das zonas de inibição das membranas nas bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> , A) QBMM, B) QAMM, C) QBMM + cúrcuma e D) QAMM + cúrcuma	56
Figura 10- Imagens fotográficas das zonas de inibição das soluções precursoras das membranas na bactéria <i>E. coli</i> , A) QBMM, B) QAMM, C) QBMM + cúrcuma e D) QAMM e cúrcuma	57
Figura 11- Análises estatísticas entre os grupos na bactéria <i>E. coli</i>	58
Figura 12- Imagens fotográficas das zonas de inibição das soluções precursora das membranas na bactéria <i>S. aureus</i> , A) QBMM, B) QAMM, C) QBMM + cúrcuma e D) QAMM + cúrcuma	59
Figura 13- Análises estatísticas entre os grupos na bactéria <i>S. aureus</i>	59
Figura 14- Gráfico de redução do alamarBlue de células L929 no período de 24 e 72 horas.....	62
Figura 15 - Gráfico da proliferação das células L929 do ensaio Picogreen no período de 24 e 72 horas.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Síntese de dados obtidos em publicações referente a comparação da massa molar da quitosana e sua ação em fungos.....	29
Tabela 2- Síntese de dados obtidos em publicações referente a comparação da massa molar da quitosana e sua ação em bactérias.....	32
Tabela 3- Composição das membranas produzidas	43
Tabela 4- Medidas de espessura das membranas.....	51
Tabela 5- Valores dos ângulos de contato entre a água e as membranas	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ATR	Reflectância atenuada
CUR	Curcumina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier
\overline{GA}	Grau de acetilação médio
GPC	Cromatografia de exclusão por tamanho
\overline{MM}	Massa molar média
QAMM	Quitosana de alta massa molar
QBMM	Quitosana de baixa massa molar
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>T. rubrum</i>	<i>Trychophyton rubrum</i>
UV	Luz ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 QUITOSANA	21
3.1.1 Mecanismo de ação antimicrobiana da quitosana.....	22
3.1.2 Atividade de reparação tecidual da quitosana	24
3.1.3 Massa molar da quitosana e relação com a atividade antimicrobiana.....	25
3.2 CÚRCUMA.....	33
3.2.1 Atividade antimicrobiana da cúrcuma e curcumina	34
3.2.2 Atividade de reparação tecidual da cúrcuma	35
3.3 MICRO-ORGANISMOS	36
3.3.1 Bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	36
3.3.2 Fungo <i>Trychophyton rubrum</i>	37
3.4 PELE E REPARAÇÃO TECIDUAL	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 SELEÇÃO E AQUISIÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	42
4.2 PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS	42
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS.....	44
4.3.1 Medidas de espessura.....	44
4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	44
4.3.3 Ângulo de Contato.....	45
4.4 TESTES IN VITRO EM MICRO-ORGANISMOS.....	45
4.4.1 Testes in vitro sob cultura de fungos	46
4.4.2 Testes in vitro sob cultura de bactérias	46
4.5 TESTES IN VITRO SOB CULTURA DE FIBROBLASTOS.....	47
4.5.1 Linhagens celulares e condições de cultura.....	47
4.5.2 Atividade metabólica/viabilidade.....	48
4.5.3 Ensaio da proliferação celular	48
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4.7 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS.....	50
5.1.1 Formações das membranas.....	50
5.1.2 Medidas de espessura.....	50
5.1.3 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	51

5.1.4 Ângulos de contato	53
5.2 BIOATIVIDADE EM MICRO-ORGANISMOS	54
5.2.1 Experimentos em fungos	54
5.2.2 Experimentos em bactérias	56
5.3 BIOATIVIDADE SOB CULTURA DE FIBROBLASTOS	61
5.3.1 Atividade metabólica/viabilidade.....	61
5.3.2 Proliferação celular.....	63
6 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

A utilização de materiais biodegradáveis para aplicações biomédicas é uma tendência atual para substituição de materiais convencionais. Dentre os biomateriais utilizados e os tipos de nano e microestruturas desenvolvidas, destaca-se o emprego do polissacarídeo quitosana. Devido às características como biocompatibilidade, baixo custo, biodegradabilidade e obtenção de fonte renovável (podendo ser obtido a partir de rejeitos da indústria pesqueira), a quitosana é um polímero que pode ser utilizado com finalidade biomédica no tratamento de diversas patologias (MUXIKA et al., 2017; RAJOKA et al., 2019; ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015).

Sabe-se que a resistência microbiana é um sério problema de saúde pública. A seleção crescente de cepas resistentes aos antibióticos e antifúngicos convencionais, torna os tratamentos longos e dispendiosos (TAMARA et al., 2018; VALDÉS; CABRERA; MASERRA, 2017). Devido a esses fatores, a utilização de biocompostos, não tóxicos e de baixo custo constituem uma alternativa para diminuir a quantidade administrada de antibióticos e antifúngicos clássicos (SARDI et al., 2013).

Essa busca por novos antimicrobianos, de origem natural, tem conferido à quitosana um grande potencial de aplicações, pois estudos sugerem que sua ação se dá diretamente no desenvolvimento/crescimento dos patógenos, conferindo a quitosana propriedades bactericida, bacteriostática, fungicida e fungistática (GARCIA et al., 2018; KULIKOV et al., 2014; YOUNES et al., 2014).

Existente em pequenas quantidades na natureza, a quitosana é obtida principalmente através da desacetilação da quitina, um polissacarídeo encontrado de forma abundante como principal constituinte do exoesqueleto de invertebrados, como crustáceos, moluscos, anelídeos e celenterados, podendo ainda estar presente em insetos e na composição da parede celular de fungos e leveduras (EL KNIDRI et al., 2018; ISLAM; BHUIYAN; ISLAM, 2017; KOU; PETERS; MUCALO, 2021).

A quitosana possui atividade microbiana tanto frente bactérias quanto contra alguns fungos e algas (KONG et al., 2010; YOUNES et al., 2014). Apesar do mecanismo real de inibição da quitosana ainda não ser totalmente compreendido, estudos mostram que sua atividade depende da estrutura química do polissacarídeo e do micro-organismo utilizado (MACEDO et al., 2022).

Vários trabalhos abordam a influência da média massa molar (\overline{MM}) da quitosana em suas propriedades antimicrobianas, porém, poucos evidenciam a diferença entre a (\overline{MM}) deste polímero e o efeito antimicrobiano. A utilização da massa molar específica pode explicar a maior eficiência do polímero contra diferentes microorganismos com diferentes propriedades de membranas (KULIKOV et al., 2014; YOUNES et al., 2014). Além da atividade antimicrobiana, estudos mostram que a quitosana tem efeitos anti-inflamatórios, podendo auxiliar a reparação de feridas em diferentes estágios de cicatrização (LIU et al., 2018; SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006).

A cúrcuma longa é outro material que tem sido muito utilizado para o tratamento de certas doenças e problemas de pele (RADULY et al., 2021; SONG et al., 2019). Em seu rizoma encontramos vários compostos, sendo o principal deles um pigmento bioativo chamado de curcumina (CUR), composto fenólico de origem natural, sendo a parte mais utilizada da planta devido à presença de pigmentos curcuminóides de coloração amarela intensa, que atua como corante e tempero alimentar, bem como no tratamento de várias doenças. Estudos indicam que o derivado curcuminóide possui ação anti-inflamatória (BARCHITTA et al., 2019; SONG et al., 2019; XIANG et al., 2018), antifúngica (RADULY et al., 2021; SHOME et al., 2016) e antibacteriana (DAI et al., 2020; MUNIR et al., 2022; TEOW et al., 2016).

Sabe-se que quando o polímero é manipulado em nanoescala, sua atividade antimicrobiana aumenta, apresentando atividade biológica versátil devido às alterações em suas características físico-químicas. O tamanho, a maior área superficial, natureza catiônica, os grupos funcionais ativos, eficiência de encapsulação quando utilizado puro ou através de misturas com outros componentes e a densidade de cargas fazem com que o material tenha maior interação com a superfície das células microbianas (SAHARAN et al., 2013).

Uma grande variedade de métodos utilizados no desenvolvimento de micro e nanoestruturas de quitosana é encontrada na literatura (KRAVANJA et al., 2019; UL-ISLAM et al., 2023). Dentre eles, a técnica de formação de filmes finos, denominada *casting*, vem há algum tempo sendo bastante utilizada para formação de membranas biodegradáveis. Nesse método, a solução do polímero em meio ácido é vertida em um molde para secagem e o solvente é evaporado. Esse processo de fabricação de nanobiomateriais vêm atraindo atenção na área de materiais, pois formam produtos com propriedades favoráveis, baixo custo no aparato experimental, com rápida

obtenção das membranas e boa reprodutibilidade, que podem ser utilizadas em várias aplicações biomédicas.

Diante do exposto, neste trabalho membranas de quitosana com diferentes massas molares, puras e associadas à cúrcuma, foram produzidas através da técnica de formação de filmes finos *casting*. As membranas foram caracterizadas e avaliadas sua bioatividade na inibição do crescimento de micro-organismos e na viabilidade (citotoxicidade e proliferação) do crescimento de cultura de fibroblastos.

2 OBJETIVOS

Avaliar a bioatividade de membranas produzidas a base de quitosana com diferentes massas molares e quitosana associada à cúrcuma.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir membranas a base de quitosana de baixa massa molar (QBMM) e alta massa molar (QAMM) puras e associadas a cúrcuma através da técnica *casting* (evaporação de solvente por derramamento).
- Caracterizar as propriedades físico-químicas das membranas através de medidas de espessura, medidas de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e ângulo de contato.
- Realizar testes microbiológicos para comparação da eficiência antimicrobiana sobre o fungo *Trychophyton rubrum* (*T. rubrum*), bactérias *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*).
- Testar experimentos *in vitro* em cultura de células de fibroblastos a fim de avaliar a toxicidade, proliferação e viabilidade das membranas produzidas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 QUITOSANA

A quitosana é encontrada na natureza em pequenas quantidades nas paredes celulares de alguns fungos (Zigomicetos), porém sua principal forma de obtenção é a desacetilação da quitina, um polissacarídeo caracterizado por uma estrutura fibrosa, encontrado em carapaças de crustáceos, alguns insetos e moluscos bem como na parede celular de alguns fungos e leveduras, fornecendo suporte e sustentação (EL KNIDRI et al., 2018; ISLAM; BHUIYAN; ISLAM, 2017; KOU; PETERS; MUCALO, 2021).

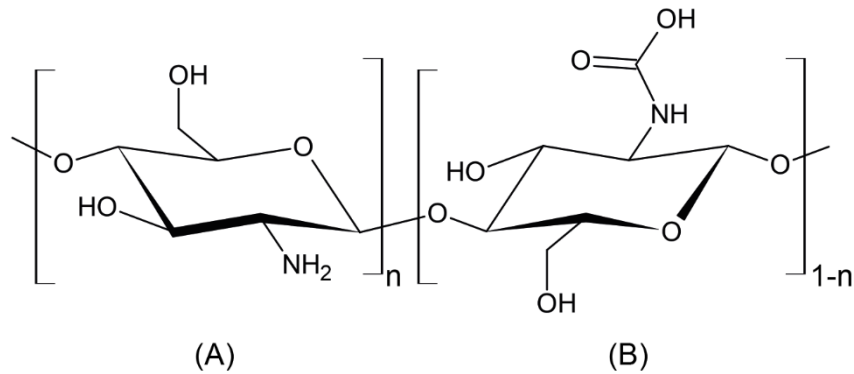
O processo de obtenção da quitosana a partir da quitina ocorre através da hidrólise dos grupos acetil. A hidrólise é geralmente realizada através da utilização de bases fortes (meio alcalino), como exemplo o aquecimento da quitina em uma solução alcalina concentrada (hidróxido de sódio ou de potássio), sob altas temperaturas, ou podendo-se utilizar enzimas e micro-organismos (HEMBACH; CORD-LANDWEHR; MOERSCHBACHER, 2017; JOSEPH et al., 2021).

Essa transformação ocorre quando o grau de desacetilação da quitina, insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, alcança um valor superior a 50%, tornando-se solúvel em meio aquoso ácido, onde há protonação de seus grupos aminos (CAMPANA-FILHO et al., 2007). As proporções relativas dessas unidades geram características estruturais distintas, como o grau médio de acetilação (\overline{GA}) e a massa molar (\overline{MM}), cujas características estruturais estão relacionadas às propriedades físico-químicas e biológicas do polímero (MACEDO et al., 2022; MARQUES et al., 2020; SAHARIAH; MÁSSON, 2017).

Estruturalmente, esses polissacarídeos, são considerados biopolímeros, formam uma longa cadeia linear compostas por unidades 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopiranosose (GlcN) e 2-amina-2-deoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). O que difere a estrutura entre quitina e a quitosana é a proporção encontrada de cada uma dessas unidades repetitivas. Na quitina predominam os grupos acetamina, enquanto na quitosana predominam os grupos amina. No processo de desacetilação alcalina da quitina, os grupos N-acetil (-COCH₃) são convertidos em grupos amino (-NH₂). Durante esse processo, ligações N-acetil do polímero quitina

vão se rompendo dando origem a D-glicosamina que contém um grupo amina livre (ISLAM; BHUIYAN; ISLAM, 2017; YEUL; RAYALU, 2013) (Figura 1).

Figura 1- Representação esquemática da estrutura química das unidades repetitivas de quitina e quitosana, (A) GlcN e (B) GlcNAc



Fonte: Macedo et al. (2020)

Alguns fatores favorecem a utilização da quitosana em aplicações biomédicas, na indústria têxtil, alimentícia, de cosméticos e em pesquisas (HAMED; ÖZOGUL; MAO et al., 2017; REGENSTEIN, 2016). A exemplo, o fato de poder ser obtida da quitina, material de fonte renovável abundante, que aproveita os subprodutos da pesca de crustáceos muitas vezes rejeitados por indústrias pesqueiras, torna seu uso ecológica e financeiramente viável, associado ao fato de possuir propriedades físico-químicas e biológicas favoráveis como biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioatividade, mucoadesividade, baixa toxicidade e atividade antimicrobiana. Além disso, a quitosana apresenta aprovação para uso pela agência americana *Food and Drug Administration (FDA-USA)*, que regulamenta o uso de produtos nos alimentos e fármacos (CASADIDIO et al., 2019; KOU; PETERS; MUCALO, 2021; MUÑOZ et al., 2018; MUXIKA et al., 2017; RAJOKA et al., 2019).

3.1.1 Mecanismo de ação antimicrobiana da quitosana

O mecanismo de ação envolvido na atividade antimicrobiana da quitosana ainda não está definido de forma clara, mas autores descrevem que estes podem estar relacionados as características da membrana e da parede celular do micro-

organismo (LI; YANG; YANG, 2015; SEVERINO et al., 2015). Mais frequentemente são descritos os seguintes mecanismos:

a). Interação eletrostática entre as cargas positivas da quitosana com as cargas negativas da superfície de micro-organismos

Há constatação de pesquisas em que a utilização da quitosana resultou em aglutinação das células microbianas e inibição de crescimento de micro-organismos. Tal fato se deve a seus grupos amino que, quando em contato com os fluidos fisiológicos, se tornam protonados e se ligam aos grupos aniônicos, como lipossacarídeos e proteínas, presentes no envoltório celular do micro-organismo (MACHADO et al., 2020; MADUREIRA et al., 2015; MARTINS et al., 2020). Em outras palavras, nos organismos que possuem membrana celular com carga negativa, há interação eletrostática com a quitosana, que possui carga positiva.

Esta interação afeta a permeabilidade da membrana e resulta em vazamento de eletrólitos e outros constituintes, levando alterações que provocam inibição do crescimento bacteriano, da atividade celular e da permeabilidade da membrana (SEVERINO et al., 2015). Através desse modelo é possível supor que quanto maior for o número de aminas catiônicas, maior será a atividade antimicrobiana. Atualmente este mecanismo de ação antibacteriana da quitosana é o mais aceito.

b). Ligação da quitosana com os lipídeos da membrana, predominantemente ácido lipoteicóico e a complexação de metais

Nesse caso, ocorre a formação de uma membrana polimérica na superfície da célula, complexando metais, que provoca a diminuição da entrada de nutrientes essenciais para o crescimento microbiano ou, ainda, pode funcionar como uma barreira de oxigênio que pode interferir no crescimento de bactérias aeróbias (LI et al., 2010; YUAN; CHEN; LI, 2016).

A quitosana apresenta uma grande capacidade de se ligar a metais. O grupamento amino presente na molécula de quitosana é responsável pela adsorção de cátions metálicos por quelação (GOY; BRITO; ASSIS, 2009).

c). Penetração das cadeias poliméricas da quitosana no núcleo celular dos micro-organismos

Nessa hipótese de mecanismo de ação, a penetração da quitosana dentro do núcleo dos micro-organismos pode inibir a transcrição do DNA em RNA (GOY; BRITO; ASSIS, 2009), levando a célula a morte.

Autores sugerem que os três mecanismos descritos acima podem ocorrer de forma simultânea, mas com intensidades diferentes a depender dos diferentes gêneros de micro-organismos, que respondem de forma diferente a ação da quitosana. Além de fatores intrínsecos ao micro-organismo, fatores extrínsecos são descritos na literatura como influenciadores da atividade antimicrobiana da quitosana, como o pH do meio, a densidade de carga positiva, a massa molar, e a quantidade (concentração) de quitosana (HOSSEINNEJAD; JAFARI, 2016; LIZARDI-MENDOZA; MONAL; VALENCIA, 2016; SAHARIAH; MÁSSON, 2017).

3.1.2 Atividade de reparação tecidual da quitosana

A quitosana tem sido considerada um biomaterial eficiente no processo de reparação tecidual devido suas propriedades antimicrobianas (KONG et al., 2010; YOUNES et al., 2014), analgésicas, coagulante e de reparação (LIU et al., 2018; SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006). Vários estudos abordam sua ação em diferentes fases do processo de reparação tecidual, fenômeno bioquímico e fisiológico que visa restabelecer a integridade anatômica do tecido injuriado (LIU et al., 2018; OLIVEIRA, DIAS., 2012; PAUL; SHARMA, 2004).

Durante a fase de hemostasia, a quitosana auxilia na homeostase, estimulando a coagulação sanguínea e aumentando a expressão de uma glicoproteína (GPIIb-IIIa) nas membranas plaquetárias, promovendo assim a adesão das plaquetas à parede vascular e a agregação plaquetária (LIU et al., 2018; PAUL; SHARMA, 2004).

Estudos sugerem que a quitosana diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1 beta (IL-1 β) o que pode ser benéfico para reduzir a intensidade da resposta inflamatória (MORI et al., 1997; HOWLING et al., 2001; RIBEIRO et al., 2021). Por outro lado, a quitosana pode estimular a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10). Essa indução pode contribuir para a resolução eficaz da inflamação e para a transição para as fases subsequentes do reparo tecidual. Ainda pode ativar e acelerar

a migração de neutrófilos e macrófagos para o local da lesão (SHI et al., 2006). Nesse processo, macrófagos são ativados por oligômeros, que liberam interleucinas-1 e estimulam a proliferação de fibroblastos, elemento celular importante na fase subsequente da cicatrização, a proliferação (OLIVEIRA, DIAS., 2012).

Na proliferação, ocorre a formação e deposição do tecido de granulação e angiogênese. Nessa fase, a proliferação dos fibroblastos pela quitosana leva a liberação de *N*-acetilglicosaminidase, o qual libera monômeros necessários à biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular. Além do ácido hialurônico, os fibroblastos estimulam a produção de fibronectina, elastina, glicosaminoglicanas (LIU et al., 2018; SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006).

Há evidências de que a quitosana pode interagir com fatores de crescimento para influenciar positivamente o processo de cicatrização. Os fatores de crescimento são proteínas bioativas que desempenham papéis cruciais na regulação de processos celulares, incluindo a proliferação, migração e diferenciação celular, todos essenciais para a reparação tecidual. Dentre os fatores de crescimento, destacam-se o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), que induz a migração de macrófagos para áreas feridas, levando a aumento da secreção de colágeno, e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que estimula a angiogênese além de promover a síntese de glicosaminoglicanos, proteoglicanos e colágeno (HOWLING et al., 2001; WANG et al., 2020).

A quitosana, ainda absorve os fluidos provenientes da ferida e promove um efeito analgésico devido à ionização dos seus grupos (LIU et al., 2018; PAUL; SHARMA, 2004).

3.1.3 Massa molar da quitosana e relação com a atividade antimicrobiana

A massa molar média (\overline{MM}) da quitosana varia de acordo com sua origem e seu processo de obtenção. Parâmetros como concentração da solução alcalina, temperatura, tempo e condições atmosféricas, empregadas na reação de desacetilação da quitina, estão entre os fatores que influenciam essa variação que pode afetar a solubilidade, a viscosidade, a biodegradabilidade, a cristalinidade, a biocompatibilidade e a resposta celular em suas aplicações (LIZARDI-MENDOZA; MONAL; VALENCIA, 2016; MARQUES et al., 2020).

Entre os métodos para caracterização da (\overline{MM}) da quitosana estão a cromatografia de permeação em gel (METHACANON et al., 2003), cromatografia de exclusão por tamanho (NGUYEN et al., 2017) e viscosimetria capilar (GARCIA, 2001). A partir da determinação da massa molar, ocorre a classificação do polímero em baixa, média ou alta massa molar, sendo que alguns autores ainda utilizam o termo oligoquitosana para definir quitosanas de cadeia curta (geralmente abaixo de 10.000 g/mol) (GOY; BRITO; ASSIS, 2009; GROBLER, 2018; KULIKOV et al., 2014).

Essa característica físico-química da quitosana é importante para entender suas propriedades funcionais. Manipulando a \overline{MM} da quitosana, as propriedades funcionais podem ser controladas; por exemplo, a viscosidade e a solubilidade. Devido às alterações nessas propriedades, autores sugerem que a \overline{MM} é um fator importante que interfere na atividade antimicrobiana da quitosana e leva a mecanismos de ação diferentes na inibição de micro-organismos, sendo esta uma característica importante a ser determinada previamente para o desenvolvimento de um biomaterial (DOTTO; VIEIRA; PINTO, 2015; GARCIA et al., 2018, 2020; KAYA; ASAN-OZUSAGLAM; ERDOGAN, 2016; KULIKOV et al., 2014).

Conforme dito anteriormente, além das características da membrana celular e da parede dos fungos, estudos relatam que efeitos antimicrobianos distintos podem ser observados quando quitosana de diferentes \overline{MM} são aplicadas. A depender da massa molar da quitosana (oligo-quitosana, baixa, média e alta massa molar) essa interação pode ocorrer de diferentes maneiras, sendo este um dos fatores extrínsecos que podem influenciar seu modo de ação (GARCIA et al., 2018; KULIKOV et al., 2014; YOUNES et al., 2014).

A literatura menciona diferentes mecanismos de ação da quitosana contra fungos, baseado principalmente na interação eletrostática entre cargas positivas dos grupos amino protonados da quitosana e as cargas negativas da parede celular, causando seu rompimento e a liberação de componentes intracelulares (LI; YANG; YANG, 2015; SEVERINO et al., 2015), o que está principalmente relacionado com a quitosana de alta massa molar. Já a quitosana de baixa massa molar pode apresentar um duplo mecanismo de ação, conseguindo penetrar na parede celular e se combinar com o DNA e inibir a síntese de mRNA e a transcrição de DNA, e ainda causar ruptura da membrana celular (KIM; RAJAPAKSE, 2005; KONG et al., 2010). Também pode

ocorrer a inibição do crescimento microbiano pelo quelatão de nutrientes e metais essenciais (YUAN; CHEN; LI, 2016).

Garcia et al. (2018) realizaram estudo para avaliar a \overline{MM} da quitosana na atividade antifúngica contra células planctônicas e biofilme de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. Soluções de quitosanas com alta (~247.800 g/mol), média (~140.500 g/mol) e baixa (~75.600 g/mol) \overline{MM} foram preparadas em 1% (p/v) de ácido acético glacial 99% e testadas nos fungos. Nas células planctônicas o efeito da \overline{MM} foi observado para as cepas de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, com alta \overline{MM} apresentando maior atividade antimicrobiana. Para *C. albicans*, a \overline{MM} de quitosana não modulou o efeito inibitório. Com relação aos biofilmes, a \overline{MM} não teve influência na atividade da quitosana.

Ainda, a \overline{MM} da quitosana foi testada contra células planctônicas de *Candida spp.* em estudos realizados por Kulikov et al. (2014), onde oito amostras de oligoquitosanas, com \overline{MM} na faixa de 0,73-19,99 kDa, causaram alterações graves da parede celular e estrutura celular interna do fungo testado. As oligoquitosanas mostraram uma alta atividade fungistática e fungicida e as concentrações mínimas inibitórias (MICs) foram significativamente dependentes das \overline{MM} . Oligoquitosanas com \overline{MM} entre 10 e 20 kDa exibiram atividade máxima na supressão da multiplicação de células de levedura e causaram alteração severa da parede celular do fungo. TAYEL et al. (2010), testou quitosanas de diferenças \overline{MM} (32.000, 38.000, 138.000 e 184.000 g/mol) contra três cepas de *C. albicans* e provou que a quitosana interage principalmente com parede celular de levedura, causando inchaço severo, formas ásperas assimétricas e lise. As amostras com menor \overline{MM} foram as mais eficazes.

Outros estudos realizados com espécies de cândidas também evidenciaram efeito inibitório desse fungo a depender da \overline{MM} e do micro-organismo testado (KAYA; ASAN-OZUSAGLAM; ERDOGAN, 2016; SEYFARTH et al., 2008). Os resultados encontrados podem ser com base nas diferenças da composição e na densidade de cargas da parede celular das espécies de cândida, onde *C. albicans* tem menor densidade de carga negativa na superfície da célula, seguida por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (PALMEIRA-DE-OLIVEIRA et al., 2011).

Estudos conduzidos por Garcia et al. (2020), com quitosanas de alta (984,7 kg.mol⁻¹), média (467,2 kg.mol⁻¹) e baixa (206,4 kg.mol⁻¹) \overline{MM} também mostraram uma

grande variação nos valores MIC para a espécie *Sporothrix brasiliensis*. A quitosana de baixa \overline{MM} apresentou um maior efeito inibitório do que as outras quitosanas, tanto para as formas planctônicas como de biofilme do fungo, visto que menores quantidades de quitosana foram necessárias para reduzir o crescimento de *S. brasiliensis*. Os autores evidenciam que esses resultados podem ser devido à composição da parede celular desse fungo, que apresenta grande quantidade de lipídios e proteínas, sendo que os compostos que conferem cargas negativas à superfície da parede celular favorecem a interação eletrostática com a quitosana, que possui carga positiva.

Em estudos realizados por Younes et al. (2014), quinze amostras de quitosanas com diferentes \overline{MM} foram utilizadas para investigar a eficácia antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, bactérias Gram-positivas e fungos (*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* e *Alternaria solani*). Em relação à atividade antifúngica, o efeito inibitório testado frente aos fungos *A. niger* e *A. solani* não demonstrou dependência com a \overline{MM} da amostra de quitosana utilizada. Já para o fungo *F. oxysporum* houve aumento no efeito inibitório com o aumento da \overline{MM} . Foi verificado que nas bactérias, o efeito inibitório diferiu em relação a \overline{MM} das amostras de quitosana, sendo que nas Gram-negativas a atividade antibacteriana aumentou com a diminuição da \overline{MM} , enquanto o efeito oposto foi observado para as Gram-positivas.

Em outro estudo realizado, a tendência observada contra *Aspergillus flavus* foi um aumento da atividade do polímero com o aumento da \overline{MM} (GABRIEL; TIERA; TIERA, 2015). Neste estudo três quitosanas de diferentes \overline{MM} (16,9; 176 e 517,7 kDa) foram utilizadas examinando o grau de crescimento micelial de *A. flavus*. Os efeitos inibitórios aumentaram com aumento das \overline{MM} de polímero (16,9 kDa < 176 kDa < 517,7 kDa). No entanto, QIU et al. (2014) observaram o inverso para o crescimento de *Fusarium concentricum*, inibido em 89% e 74% para baixa e alta \overline{MM} , respectivamente. A atividade antifúngica da quitosana contra *B. cinerea* também diminuiu com aumento da \overline{MM} (BADAWY; RABEA, 2009).

Embora os fungos estudados difiram, os resultados mostraram uma forte dependência dos seus índices de inibição com a \overline{MM} da quitosana. Diferenças na \overline{MM} levaram a diferentes tipos de interação com a célula fúngica, levando a diferentes

mecanismos de ação. A Tabela 1 apresenta estudos que evidenciaram o uso de quitosana com diferentes massas molares frente a fungos.

Tabela 1- Síntese de dados obtidos em publicações referente a comparação da massa molar da quitosana e sua ação em fungos

Autor/Ano	Amostra	Método de aplicação	Fungo testado	Resultados encontrados
Garcia et al. (2018)	Quitosanas com alta (~247.800 g/mol), média (~140.500 g/mol) e baixa (~75.600 g/mol) \overline{MM}	Solução de quitosana dissolvidas em ácido acético glacial	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i>	Nas células planctônicas, para o <i>C. tropicalis</i> e <i>C. parapsilosis</i> o crescimento fúngico diminuiu com o aumento da \overline{MM} da quitosana. Para <i>C. albicans</i> , a \overline{MM} de quitosana não modulou o efeito inibitório Nos biofilmes, a \overline{MM} não teve influência na atividade da quitosana.
Kaya; Asan-Ozusaglam; Erdogan, (2016)	Quitosana com baixa (3.220 g/mol) \overline{MM} obtida do escorpião <i>Mesobuthus gibbosus</i> e quitosana comercial de média \overline{MM}	Solução de quitosana dissolvidas em ácido acético	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i>	Para a levedura <i>C. albicans</i> , a quitosana de baixa \overline{MM} apresentou maior efeito inibidor Para <i>C. glabrata</i> , a \overline{MM} de quitosana não modulou o efeito inibitório
Kulikov et al. (2014)	Oligoquitosanas com \overline{MM} de 0,73, 1,52, 2,09, 5,98, 8,39, 9,69, 15,06, 19,99, 70 e 600 kDa	Solução de oligoquitosana	<i>C. albicans</i>	As oligoquitosanas mostraram uma alta atividade fungistática e fungicida. Oligoquitosanos com \overline{MM} entre 10 e 20 kDa exibiram atividade máxima na supressão da multiplicação de células de levedura e causaram alteração severa da parede celular
Tayel et al. (2010)	Quitosanas com \overline{MM} de 32.000, 38.000, 138.000 e 184.000 g/mol	Solução de quitosana dissolvidas em ácido acético	<i>C. albicans</i>	As amostras inibiram efetivamente o crescimento de cepas do <i>C. Albicans</i> . As amostras com menor \overline{MM} foram as mais eficazes

Seyfarth et al. (2008)	Quitosanas de baixa e alta MM	Solução de quitosana	<i>C. albicans</i> <i>C. krusei</i> <i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> foram as espécies mais sensíveis. A atividade antifúngica decresce com a diminuição da MM
Garcia et al. (2020)	Quitosanas com alta (984,7 kg.mol ⁻¹), média (467,2 kg.mol ⁻¹) e baixa (206,4 kg.mol ⁻¹) MM	Solução de quitosana dissolvidas em ácido acético	<i>S. brasiliensis</i>	Amostras de alta, média e baixa MM foram capazes de inibir <i>S. brasiliensis</i> em até 60%, 69% e 88%, respectivamente Na atividade metabólica, quitosana de alta, média e baixa MM, apresentaram valores de inibição de 61%, 70% e 89%, respectivamente
Dotto; Vieira; Pinto, (2015)	Quitosana com \overline{MM} de 150.000 e 300.000 g/mol	Solução de quitosana	Leveduras Bolores	A amostra com <i>MM</i> menor apresentou melhor efeito microbiológico
Gabriel; Tiera; Tiera, (2015)	Quitosanas com MM 16,9, 176 e 517,7 kDa	Solução de quitosana	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	Aumento da atividade do polímero com o aumento da MM
Younes et al. (2014)	Quinze amostras de quitosanas com <i>MM</i> variando de 42.500 a 135.000 g/mol	Solução de quitosana	<i>A. niger</i> , <i>F. oxysporum</i> <i>A. solani</i>	Para os fungos <i>A. niger</i> e <i>A. solani</i> não houve dependência do efeito inibitório com a \overline{MM} Para os fungos <i>F. oxysporum</i> houve aumento no efeito inibitório com o aumento da \overline{MM}
Qiu et al. (2014)	Quitosanas de baixa e alta MM	Solução de quitosana dissolvidas em ácido acético	<i>F. concentricum</i>	Quitosana de baixa e alta MM, apresentaram valores de inibição de 89% e 74%, respectivamente
Badawy; Rabea, (2009)	Solução de quitosana de MM (0,5 × 10 ⁴ , 3,7 × 10 ⁴ , 5,7 × 10 ⁴ e 2,9 × 10 ⁵ g / mol)	Solução de quitosana	<i>B. cinerea</i>	A atividade antifúngica aumentou à medida que a MM da quitosana diminuiu

Fonte: Autoria própria

Em relação à atividade antibacteriana, vários estudos têm demonstrado que existe relação entre a \overline{MM} das cadeias poliméricas da quitosana e o seu mecanismo de ação frente a grupos de micro-organismos específicos, o que pode interferir na inibição do crescimento destes, parecendo ser fundamental para compreender a eficácia da quitosana (MACEDO et al., 2022; MELLEGÅRD et al., 2011; YUAN et al., 2020).

A exemplo, Bano e colaboradores (2017), conduziram um estudo onde atividade a bacteriana de quitosanas com \overline{MM} variável foi investigada contra os patógenos *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. mirabilis* e *S. aureus*. Os efeitos inibitórios também diferiram para quitosanas com \overline{MM} distintas nos diferentes tipos de bactérias. A quitosana de alta \overline{MM} (220.000 g/mol) não mostrou nenhuma atividade bacteriana, enquanto as quitosanas de baixa \overline{MM} (801, 473 e 259 g/mol) exibiram atividade antibacteriana contra todas as cepas sob investigação. Foi observado que *P. aeruginosa* e *E. coli* foram mais sensíveis frente a todas as quitosanas de baixa \overline{MM} . Além disso, quanto menor a \overline{MM} da quitosana, maior foi o efeito inibitório. Os autores sugeriram que a eficiência antibacteriana da quitosana depende da \overline{MM} e concentração utilizada.

Ainda, estudos realizados por Younes et al. (2014), mostraram que o uso de quitosanas com diferentes \overline{MM} apresentaram diferentes efeitos em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Outros estudos realizados com diferentes espécies de bactérias também verificaram que a atividade antimicrobiana da quitosana está diretamente relacionada com a \overline{MM} , assim como ao micro-organismo estudado (KULIKOV et al., 2014; YOUNES et al., 2014). Essas diferenças encontradas na ação antimicrobiana da quitosana, para as diferentes espécies, podem estar relacionados com a parede celular do micro-organismo com base na composição e densidade de carga negativa (LI et al., 2010; LI; YANG; YANG, 2015; SEVERINO et al., 2015).

Além disso, diferenças na \overline{MM} levam a diferentes tipos de interação com a célula (ou parede celular), levando a distintos mecanismos de ação. Uma hipótese é a de que quitosanas com alta \overline{MM} não conseguem penetrar pela membrana celular e, portanto, formam películas (barreira física) ao redor da célula que bloqueia o transporte de nutrientes, resultando em morte celular (KONG et al., 2008; LI et al.,

2010). Quitosanas de alta \overline{MM} podem ainda interagir ou se ligar à membrana celular para modificar sua permeabilidade, causando perturbações na célula e fuga do material intracelular (GARCIA et al., 2020). Já a quitosana com baixa \overline{MM} tem maior facilidade em penetrar nas células microbianas, e assim, causam a inibição de várias enzimas, interrompem a síntese de proteínas, ligam-se ao DNA inibindo a síntese de mRNA, causando distúrbios no metabolismo desses micro-organismos (KIM; RAJAPAKSE, 2005; KULIKOV et al., 2014; YOUNES et al., 2014). A Tabela 2 apresenta estudos que evidenciaram o uso de quitosana com diferentes massas molares frente a bactérias.

Tabela 2- Síntese de dados obtidos em publicações referente a comparação da massa molar da quitosana e sua ação em bactérias

Autor/Ano	Amostra	Método de aplicação	Bactéria testada	Resultados encontrados
Kaya et al. (2016)	Quitosana com baixa MM (3,22 kDa) obtida do escorpião <i>Mesobuthus gibbosus</i> e quitosana comercial de média MM	Solução de quitosana dissolvidas em ácido acético	<i>L. garvieae</i> <i>B. subtilis</i> <i>S. agalactiae</i> <i>L.monocytogenes</i> <i>V. alginolyticus</i> , <i>Y. enterocolitica</i> e <i>S. enteritidis</i>).	Para a bactéria <i>L. monocytogenes</i> a quitosana de baixa MM apresentou maior efeito inibidor Para a bactéria <i>B. subtilis</i> , a quitosana de média MM apresentou maior atividade antimicrobiana
Bano et al. (2017)	Quitosanas de MM alta (220.000 g/mol) e baixa (801, 473 e 259 g/mol)	Solução de quitosana	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i> <i>S. aureus</i>	A amostra com alta MM não apresentou atividade bacteriana, enquanto as de baixa MM exibiram atividade antibacteriana <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i> foram sensíveis a todos os tipos de quitosanas. Quanto menor a MM, maior foi o efeito inibitório
Younes et al. (2014)	Quinze amostras de quitosanas com MM variando de 42,5 a 135 kDa	Solução de quitosana dissolvidas em HCL	Gram-negativas: <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>S. typhi</i> Gram-positivas: <i>S. aureus</i> <i>B. cereus</i> <i>E. faecalis</i> <i>M. luteus</i>	Para bactérias Gram-negativas a atividade antibacteriana aumentou com a diminuição da MM, enquanto o efeito oposto foi observado para as Gram-positivas

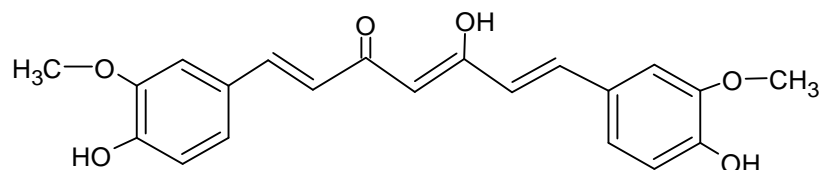
Laokuldilok et al. (2017)	Quitosanas com \overline{MW} 4,30 KDa (Quitosana comercial) e 5,1, 14,3 e 41.1 kDa (quitooligossacarídeos derivados da quitosana comercial)	Solução de quitosana dissolvida em ácido acético	Gram-positiva: <i>S. aureus</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. enteritidis</i> Gram-negativas: <i>E. coli</i>	A quitosana comercial inibiu o <i>S. aureus</i> mais eficientemente As bactérias Gram-negativas foram mais suscetíveis à inibição quanto menor a MM
Dotto; Vieira; Pinto, (2015)	Quitosana com MM de 150 e 300 kDa	Solução de quitosana dissolvida em ácido acético	Bactéria mesofílica	A amostra com MM menor apresentou melhor efeito microbiológico
Chang et al. (2015)	Quitosana com MM de 3,3, 7,1, 29,2, 72,1, 156 e 300 kDa	Solução de quitosana dissolvida em HCL	<i>E. coli</i> <i>E. aureus</i>	Em condições de pH ácido, a atividade aumentou com o aumento da MM Em pH neutro, a atividade aumentou à medida que a MM diminuiu

Fonte: Autoria própria

3.2 CÚRCUMA

A cúrcuma longa, também conhecida como açafrão indiano, açafrão-da-terra ou gengibre-dourado, é derivada da cúrcuma, uma planta herbácea perene da família do gengibre (*Zingiberácea*). Em seu rizoma é possível encontrar um pigmento bioativo chamado curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona) (Figura 2). A curcumina é um composto fenólico hidrofóbico natural, muito utilizado na culinária, e que possui diversas propriedades terapêuticas com uso seguro reconhecido por diversas agências reguladoras de saúde, incluindo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil e a *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos (AHSAN et al., 2020; HEWLINGS; KALMAN, 2017).

Figura 2- Estrutura química da curcumina



Fonte: Autoria Própria

A curcumina é um pigmento amarelo ou laranja insolúvel em água que corresponde a cerca de 3-5% da composição química do açafrão. Desde o século VII DC, encontram-se evidências de que a curcumina era usada para a saúde e preservação de alimentos na medicina tradicional chinesa e indiana (TANG, 2020).

Devido à sua estrutura química e à presença de grupos hidroxila e metóxi, a curcumina possui diversas propriedades, principalmente antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (BARCHITTA et al., 2019; SONG et al., 2019; XIANG et al., 2018).

3.2.1 Atividade antimicrobiana da cúrcuma e curcumina

A atividade antimicrobiana da cúrcuma foi constatada contra as espécies *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* (NAWAS, 2018; NEYESTANI et al., 2019) em parasitoses como *Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium* e *Leishmania* (HADDAD; SAUVAIN; DEHARO, 2011; RAI et al., 2020).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram atividade antimicrobiana da curcumina contra diferentes tipos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ADAMCZAK; OŻAROWSKI; KARPIŃSKI, 2020; HUSSAIN; ATRAY, 2022; MUNIR et al., 2022; PARHAM et al., 2020; TEOW et al., 2016) e contra diversas espécies de fungos (DIASTUTI; ASNANI; CHASANI, 2019; FERREIRA et al., 2013; PAUL; MOHANRAM; KANNAN, 2018).

Estudo realizado por Adahoun et. al. (2017) e colaboradores, através de um ensaio *in vitro* utilizando cúrcuma e nanopartículas de curcumina contra quatro cepas bacterianas diferentes, duas Gram-positivas (*Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*) e duas Gram-negativas (*Escherichia* e *Pseudomonas aeruginosa*), indicam que o composto seguro da nanocurcumina tem uma capacidade potente como atividade antimicrobiana. Os resultados mostram que as bactérias Gram-positivas tiveram maior sensibilidade do que as bactérias Gram-negativas para curcumina e nanocurcumina.

Doze diferentes concentrações de extrato de cúrcuma foram preparadas e avaliadas enquanto sua atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli*, utilizando

o método de difusão em poços de ágar. A maioria das bactérias apresentou resistência aos antibióticos, mas esses patógenos foram sensíveis ao rizoma de cúrcuma longa, o que confirma a eficácia como antibacteriano natural. Ainda, estudos realizados por Teow et al. (2016) demonstram que a curcumina é eficaz contra *S. aureus*, exercendo efeitos ainda mais potentes quando usada em combinação com vários outros agentes antibacterianos.

Referente à atividade antifúngica em experimentos *in vitro*, realizado através do método de diluição em ágar e avaliada contra *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Epidermophyton sp*, *Penicillium sp* e *T. rubrum*, os resultados exibiram atividades significativas contra *A. fumigatus*, *Epidermophyton sp*, *Penicillium sp* e *T. rubrum* (DIASTUTI; ASNANI; CHASANI, 2019). Outro estudo também demonstrou atividade antifúngica da curcumina contra *C. albicans* e outras espécies, como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e espécies de *Candidas* resistentes ao fluconazol. Os testes foram realizados utilizando o método de diluição em caldo e método de ágar; a amostra de curcumina foi associada a nitrato de prata e os valores da concentração inibitória mínima encontrados variaram de 31,2 µg/mL a 250 µg/mL. *C. glabrata* e *C. albicans* foram as espécies que tiveram maior inibição do crescimento e *C. tropicalis* foi a espécie que menos demonstrou inibição (PAUL; MOHANRAM; KANNAN, 2018).

3.2.2 Atividade de reparação tecidual da cúrcuma

A atividade antioxidante e os efeitos anti-inflamatórios da curcumina estão intimamente relacionados com a sua estrutura fenólica O-H e C-H. Esta, promove coagulação, migração de fibroblastos, formação do tecido de granulação, deposição de colágeno e controla a apoptose das células favorecendo a reepitelização, remodelação tecidual e contração da ferida. Ainda, é relatado na literatura que a curcumina pode aumentar a expressão de fatores de crescimento celular, como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que são cruciais para a regeneração de tecidos danificados (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009).

Quando aplicada em feridas, a cúrcuma é capaz de inativar as espécies reativas de oxigênio e reduzir a peroxidação lipídica. Seu efeito também é evidenciado

na redução da expressão de citocinas e genes que atuam em respostas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e citocinas pró-inflamatórias séricas, incluindo IL-6, TNF- α e IL-1 β , e os níveis de expressão de TLR4, TLR2 e TNF- α , além de suprimir a ativação de NF- κ B e os níveis de degradação de I κ B α (BARCHITTA et al., 2019; SONG et al., 2019). Possui ainda ação antioxidante, protegendo as células da pele contra danos causados por radicais livres, reduzindo o estresse oxidativo.

3.3 MICRO-ORGANISMOS

3.3.1 Bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

O *S. aureus* é uma bactéria cocos Gram-positiva, de formato esférico, com diâmetro próximo a 1 μ m que possui colônias de pigmentação amarelada. Pertencente à família *Micrococcaceae*, é um organismo anaeróbio facultativo, não esporulado e sem motilidade (MALHEIROS et al., 2009).

Frequentemente encontrada no nariz, nas vias respiratórias e na pele, nem sempre esse micro-organismo é patogênico. No entanto, devido à produção de toxinas potentes e a multiplicação em tecidos, expressando proteínas de superfície celular que se ligam e inativam anticorpos, é uma causa comum de infecções da pele e tecidos moles, sendo sua lesão típica o abscesso, que geralmente sofre necrose central (furúnculos, celulites e espinhas). Esses micro-organismos também podem se disseminar via corrente sanguínea, gerando infecções graves, de difícil tratamento, como infecções respiratórias, meningite, endocardite, septicemia, intoxicações alimentares e outras (TONG et al., 2015).

A *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, com bacilos de 1,1 a 1,5 μ m de diâmetro x 2,0 a 6,0 μ m comprimento, pertencente à família *Enterobacteriaceae* e ao gênero *Escherichia*. São caracterizadas por serem anaeróbios facultativos, que realizam oxidase negativa e catalase positiva, fermentadores de lactose, sacarose e glicose (com produção de gás), apresentando ou não motilidade (DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2016).

Embora seja um habitante da flora normal do trato intestinal inferior dos vertebrados, ajudando na produção de certas vitaminas e participando da digestão de

alimentos que não seriam digeridos sem a sua presença, essa bactéria apresenta cepas consideradas patogênicas tanto para o homem quanto para os animais (DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2016).

As infecções causadas pelas bactérias *S. aureus* e *E. coli* aumentam os gastos hospitalares e são um problema de saúde pública. Devido a fatores de virulência e por desenvolverem resistência a antibióticos, essas bactérias são alvos de estudos que buscam estratégias inovadoras de controle e drogas capazes de conter sua patogenicidade (SONG et al., 2019).

3.3.2 Fungo *Trichophyton rubrum*

De acometimento geográfico global, principalmente entre crianças, idosos e imunocomprometidos, os fungos dermatófitos estão entre os agentes etiológicos que causam infecções no homem (LEE et al., 2015). Ao invadirem tecidos como a pele, cabelo e unhas dos mamíferos, esses fungos obtêm seus nutrientes principalmente a partir da queratina dos tecidos parasitados, causando micoses conhecidas como dermatofitoses ou tineas (do latim *tineas*) (CIESIELSKA et al., 2021; MARAKI; MAVROMANOLAKI, 2016).

Os dermatófitos constituem um grupo de fungos filamentosos queratinolíticos, ou seja, utilizam substratos queratinizados como fonte de carbono, nitrogênio e enxofre. São pertencentes à classe dos *Hiphomycetes*, subdivisão *Deuteromycotina* e são divididos em três gêneros *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* (AHMADI et al., 2016). Eles estão entre os poucos fungos que causam doenças transmissíveis e sua transmissão ocorre por contato direto com escamas epidérmicas da pele, pelos ou unhas de animais e humanos infectados, ou indireto por fômites contaminados (BONTEMS et al., 2020).

Dentro os fungos classificados como gênero dermatófito, o *Trichophyton* inclui várias espécies, algumas das quais se destacam pela grande importância na micologia médica. Dentre essas espécies, o *T. rubrum* apresenta relevância clínica devido à alta prevalência de infecções, sendo uma espécie antropofílica amplamente distribuída no mundo, o que pode ser verificado através de estudos realizados na Suíça (BONTEMS et al., 2020), na Coreia do Sul (LEE et al., 2015), na Itália (VENA

et al., 2012) e na Bélgica (ROSALIE et al., 2021), que apontam essa espécie como principal agente etiológico de infecção fúngica cutânea.

No Brasil, estudos realizados no Rio Grande do Sul (ROCHA et al., 2018) e em Natal (SILVA-ROCHA; DE AZEVEDO; CHAVES, 2017) apresentaram o *T. rubrum* como a espécie clínica mais frequentemente isolada, reforçando os dados da literatura que apontam essa espécie como a de maior prevalência dentre os dermatófitos.

O *T. rubrum* tem sido considerado como um fungo antropofílico, filamentosos, patogênico e cosmopolita. Comumente esta espécie é utilizada para estudo de mecanismos moleculares relacionados ao crescimento, metabolismo, patogenicidade e resistência aos antifúngicos de micoses superficiais (FERREIRA-NOZAWA et al., 2006; MARANHÃO et al., 2011).

As micoses causadas pelo *T. rubrum* incluem um amplo espectro de manifestações clínicas, onde a infecção pode se propagar a partir de uma localização primária através de autoinoculação, e lesões secundárias podem surgir posteriormente acometendo diferentes localizações anatômicas do corpo. As lesões podem ser simultâneas, intermitentes ou podem ocorrer após um intervalo de tempo, e sua gravidade varia conforme a localização anatômica e a resposta imune do hospedeiro (PERES et al., 2010).

Dentre as principais lesões, destacam-se a *tinea pedis* (micose no pé), *tinea unguium* (micose nas unhas), *tinea cruris* (micose na virilha) e *tinea corporis* (micose na pele do corpo) (ZHENG et al., 2020). A *tinea* é consequência da reação do hospedeiro às enzimas liberadas pelo fungo durante o processo de digestão dos tecidos queratinizados para a obtenção de nutrientes (ELAVARASHI; KINDO; RANGARAJAN, 2017).

Geralmente nas infecções de pele, as lesões mais características são circulares, eritematosas, descamativas, pruriginosas e delimitadas por bordos elevados. Nas infecções de unha (onicomicoses) pode ocorrer descolamento das bordas, espessamento, aparecimento de manchas brancas e até distrofia total das unhas. A depender do estado imunológico do hospedeiro, os sintomas podem variar de brandos a severos (PERES et al., 2010; ROUZAUD et al., 2016).

Essas infecções geralmente se associam a quadros clínicos de evolução crônica, de progressão lenta, com lesões disseminadas e persistentes. Resistência terapêutica e histórico de recidivas ou de reinfecções é muito frequente nos pacientes que possuem a doença, o que pode afetar a qualidade de vida do indivíduo devido questões estéticas, complicações secundárias e da dificuldade terapêutica na prática clínica (AHMADI et al., 2016; CAFARCHIA et al., 2013). Além disso, o aparecimento de linhagens resistentes aos medicamentos antifúngicos disponíveis no mercado, e o comportamento invasivo deste agente, principalmente em pacientes com o sistema imune comprometido, levam à necessidade de se ampliar o conhecimento sobre a utilização de novos compostos antimicrobianos, na tentativa de se desenvolver estratégias terapêuticas (ROUZAUD et al., 2016; SHEN et al., 2022).

3.4 PELE E REPARAÇÃO TECIDUAL

A pele, maior órgão do corpo humano, tem como principal função revestir praticamente toda a superfície do corpo, isolando as estruturas internas do meio externo, constituindo assim uma barreira defensiva e reguladora que impede a entrada de micro-organismos e substâncias nocivas, controlando a perda de água, a movimentação de eletrólitos e macromoléculas. Sua integridade é essencial para o sistema tegumentar (JUNQUEIRA;CARNEIRO, 2013; KIERSZENBAUM, 2004).

Histologicamente, a pele é constituída por camadas distintas que possuem células com características e funções específicas. A mais superficial é denominada epiderme e a mais profunda derme. Subjacente a estas duas camadas, encontra-se a hipoderme, um tecido adiposo subcutâneo, formado por adipócitos (SZWED; SANTOS., 2015).

A camada externa da pele, a epiderme, é formada por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e avascularizado. Constituída principalmente pelos queratinócitos, melanócitos, células de *Langerhans* e células de *Merkel*, essa camada é o primeiro tecido a ter contato direto com o meio exterior e é a principal responsável pela proteção inicial a agentes externos (DOMANSKY; BORGES, 2014; KIERSZENBAUM, 2004).

Já a derme, localizada abaixo da epiderme, é formada por tecido conjuntivo altamente vascularizado composto por proteínas fibrosas como colágeno, elastina e reticulina. Dentre suas células destacam-se os fibrócitos, basófilos, histócitos e fibroblastos, esta última a principal linhagem de célula encontrada nessa camada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Nesta região encontram-se também vasos sanguíneos, linfáticos, terminações nervosas, folículos pilosos, músculos eretores do pelo, glândulas sebáceas e sudoríparas. Dentre suas funções, estão a síntese de colágeno, elastina e substância fundamental amorfa para formação da matriz extracelular (KIERSZENBAUM, 2004).

A hipoderme, camada mais profunda formada por tecido adiposo, é também chamada de tela subcutânea. Constituída por adipócitos, tem as funções de armazenar reserva energética, termorregulação e equilíbrio mecânico. Esse tecido libera adipocinas com características anti-inflamatórias que atuam principalmente na região da derme (KIERSZENBAUM, 2004).

Devido a sua ampla dimensão e distribuição anatômica, a pele está exposta a constantes danos físicos, químicos e microbiológicos que frequentemente resultam na descontinuidade do tecido, culminando em lesões e feridas cutâneas (DOMANSKY; BORGES, 2014). Uma vez a pele lesada, inicia-se o processo de reparação tecidual, fenômeno bioquímico e fisiológico que visa restabelecer a integridade anatômica do tecido injuriado. Esse processo se dá por meio de respostas e/ou interações celulares e moleculares envolvendo uma cascata de eventos descritas em fases interdependentes: hemostasia e inflamação, formação e deposição do tecido de granulação (proliferação) e remodelação da matriz extracelular (KIERSZENBAUM, 2004).

Logo após a lesão, inicia-se o processo inflamatório, que constitui uma reposta vascular e celular onde ocorre a deposição de plaquetas e células de defesa que fagocitam os restos celulares e liberam quimiotáticos que sinalizam a angiogênese (KIERSZENBAUM, 2004). Os neutrófilos estão envolvidos no controle da infecção, no desbridamento tecidual e no aumento da permeabilidade vascular. Os macrófagos são os responsáveis pela transição da fase inicial da resposta inflamatória para as fases seguintes da reparação. Nesta fase, a vasoconstrição e formação de coágulo composto por fibrina restabelece a homeostase fornecendo um ambiente para que

fatores de crescimento sejam liberados pelas plaquetas, evitando assim a perda excessiva de sangue nos vasos lesados, protegendo o organismo contra agentes externos e disponibilizando uma matriz provisória para o início da organização da ferida (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Os macrófagos, também ativam os elementos celulares das fases subseqüentes da cicatrização, tais como fibroblastos e células endoteliais (OLIVEIRA et al., 2012).

Do quarto dia até o décimo quarto dia ocorre a proliferação, onde os fibroblastos migram para o ferimento e a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido granuloso conjuntivo constituído de colágeno. Além do colágeno, os fibroblastos também secretam fibronectina, elastina, glicosaminoglicanas e ácido hialurônico. Além disso, a epiderme influencia o processo de reparação produzindo VEGF, PDGF e TGF- β (KIERSZENBAUM, 2004). Essa fase pode ser dividida em quatro eventos: reepitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno, estas sucedem o período de maior atividade da fase inflamatória e dão início a fase de remodelação, considerada a fase final do processo de reparo de uma ferida (SZWED; SANTOS, 2015).

Na fase de remodelação, as fibras colágenas liberadas de forma organizada pelos fibroblastos na fase anterior predominam, e o tecido de granulação é convertido em tecido cicatricial. Esse processo se dá por meio da substituição das fibras de colágeno do tipo III (mais delgadas) para as do tipo I (mais espessas), organizadas ao longo das linhas de tensão para que maior resistência e tração seja conferida ao tecido (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Há um equilíbrio de produção e destruição das fibras de colágeno neste período, por ação da enzima colagenase produzida por macrófagos, fibroblastos, leucócitos e células epiteliais. Com a evolução do processo, há diminuição na deposição de colágeno e a maioria das células desaparece, formando finalmente o tecido cicatricial (MACÊDO, 2013). Essa fase pode durar meses até que o tecido esteja reparado, passando por etapas de produção, deposição, digestão e reorganização (COALSON et al., 2019).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo possui uma abordagem qualitativa e quantitativa de cunho descritivo. Trata-se de uma pesquisa laboratorial, desenvolvida por meio da produção e caracterização de membranas à base quitosana de diferentes massas molares puras e associadas a cúrcuma, utilizando a técnica de *casting* para formação de filmes finos. A bioatividade foi avaliada em experimentos *in vitro* (cultura de fungos, bactérias e fibroblastos).

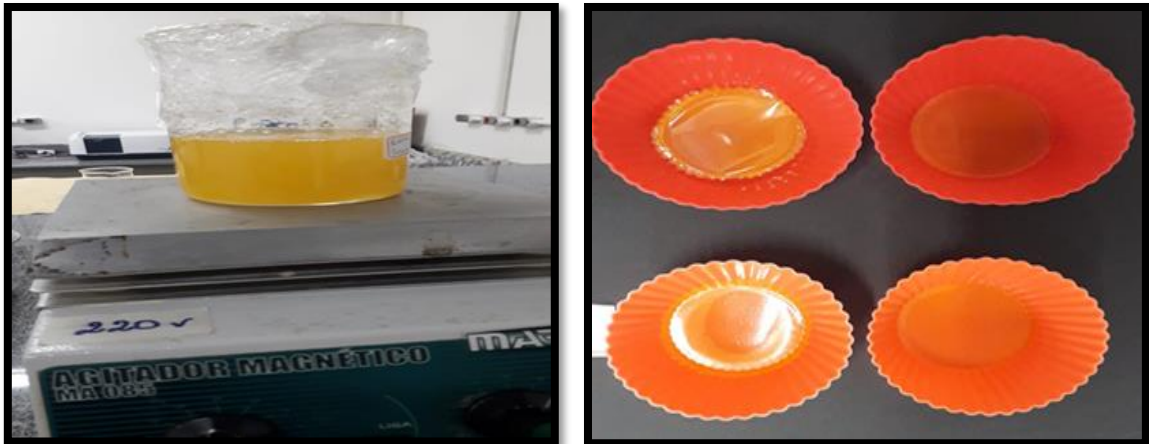
4.1 SELEÇÃO E AQUISIÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

As amostras de quitosana foram obtidas comercialmente da *Sigma-Aldrich* (São Paulo – SP, Brasil) e possuem massa molar alta e baixa. As amostras foram utilizadas como recebidas, sem nenhum tipo de purificação. O ácido acético foi obtido da Neon (Suzano, Brasil) e utilizado conforme recebido. A amostra de cúrcuma longa foi obtida comercialmente (Farmácia Malheiros, São Paulo – SP) e utilizada conforme recebida.

4.2 PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS

As membranas foram produzidas no Laboratório de Nanociências Aplicadas e Tecnologia de Plasma do Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, através da evaporação do solvente (método *casting*) a partir de uma solução de quitosana a 1% p/p dissolvida em solução aquosa de ácido acético 10% (v/v). As membranas de quitosana (tanto de alta quanto de baixa massa molar) mistas com cúrcuma foram produzidas utilizando-se o extrato de cúrcuma longa solubilizada na concentração de 1,5% (p/p em relação à massa de quitosana) na solução de quitosana a 1%. Para tanto, 20 mg de cúrcuma foram solubilizados em 15 mL de álcool etílico e misturados com 10 mL da solução aquosa de quitosana. Para a produção das membranas, 10 mL de solução foram pipetadas em placas de silicone e, as amostras foram secas ao ar em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) em fluxo de ar (Figura 3).

Figura 3- Processo de produção das membranas. a) solução precursora em agitador magnético e b) processo de secagem por evaporação de solvente, em substratos de silicone



(a)

(b)

Fonte: Autoria própria

O tempo de secagem das membranas foi de 48 a 72h. Após a secagem as membranas foram removidas manualmente das placas, armazenadas em sacos plásticos mantidos em local fresco, seco e longe da luz do sol, em temperatura ambiente até sua utilização.

Através dessa técnica foram produzidos quatro tipos de membranas, conforme descritas na Tabela 3.

Tabela 3- Composição das membranas produzidas

Membrana	Siglas
Quitosana BMM	QBMM
Quitosana BMM + Cúrcuma	QBMM + Cúrcuma
Quitosana AMM	QAMM
Quitosana AMM + Cúrcuma	QAMM + Cúrcuma

Fonte: Autoria própria

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

As membranas foram avaliadas macroscopicamente e caracterizadas quimicamente e morfologicamente utilizando as seguintes técnicas: medidas de espessura, espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR) e medidas de ângulo de contato.

4.3.1 Medidas de espessura

Para analisar a espessura, as membranas foram colocadas no micrômetro e as medidas feitas em triplicata. A partir da triplicata, a espessura média e o erro foram obtidos. Para tanto, foi utilizado o micrômetro da marca *Mitutoyo M4 Checker*.

4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

A espectroscopia FTIR foi utilizada para identificar as estruturas químicas dos componentes das membranas. As análises foram realizadas em equipamento da marca *Thermo Nicolet Nexus 470* com transformada de *Fourier* usando o modo de reflectância atenuada (ATR) (Figura 4). Os espectros foram coletados na faixa de $4000-500\text{ cm}^{-1}$ com um total de 64 varreduras e resolução de 2 cm^{-1} .

Figura 4- Equipamento utilizado para caracterização das membranas. Espectrômetro de infravermelho por transformada de *Fourier*



Fonte: Autoria própria

4.3.3 Ângulo de Contato

A molhabilidade das membranas foi analisada utilizando-se o goniômetro da marca *KSV Instruments* modelo CAM 200 (Figura 5). Para identificar os ângulos de contato entre a água e as membranas, as mesmas foram acopladas em uma placa e posicionadas centralmente a seringa. Após inserida a gota sobre a superfície da membrana, as imagens foram capturadas e os ângulos medidos pelo software. As medidas foram realizadas em triplicata (três gotas do mesmo volume) e os valores calculados através da média de 10 medições na mesma gota, obtidas automaticamente pelo software. O erro foi obtido através do cálculo de desvio padrão.

Figura 5- Equipamento utilizado para caracterização das membranas. Goniômetro da marca *KSV Instruments* modelo CAM 200



Fonte: Autoria própria

4.4 TESTES *IN VITRO* EM MICRO-ORGANISMOS

Testes microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, a fim de determinar se as membranas formadas por quitosana com massas molares diferentes e membranas mistas com quitosana e cúrcuma, são capazes de inibir o crescimento do fungo *T. rubrum* e das bactérias *S. aureus* e *E. coli*, verificando se existe inibição no crescimento do micro-organismo quando utilizadas quitosanas de massas molares diferentes (alta e baixa).

Os testes de capacidade inibitória foram realizados utilizando o método de difusão em ágar (*inhibition halo test*), relacionado as bactérias Gram-positivas (*S. aureus*), Gram-negativas (*E. coli*) e fungos dermatófitos (*T. rubrum*).

4.4.1 Testes *in vitro* sob cultura de fungos

Cepas do fungo *T. rubrum* (ATCC 28188), disponibilizadas pelo Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, foram subcultivadas em *Sabouraud Dextrose Agar* (EP/USP/ISC, Laboratório Conda S.A, Espanha), a 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), para garantir pureza e viabilidade. As colônias foram colhidas com alça bacteriológica estéril, e suspensas em 5 mL de soro fisiológico estéril 0,145 mol/L (8,5 g/L NaCl, soro fisiológico 0,85%). A suspensão resultante foi agitada em vórtex por 1 minuto e a densidade celular foi ajustada visualmente para obter uma transmitância equivalente de 0,5 *McFarland Standard* em um comprimento de onda de 530 nm. Este procedimento forneceu uma suspensão de levedura padrão contendo 1×10^6 a 5×10^6 células por mL.

Os micro-organismos foram semeados em meio ágar padrão (*Plate Count Agar*) em placas de Petri e mantidos em estufa por 14 dias. Após esse período, um disco de cada membrana (diâmetro de 6 mm), esterilizadas usando luz ultravioleta (UV) por 2 h, foi colocado no centro de cada placa de ágar, que estavam semeadas com os micro-organismos. A zona de inibição do crescimento microbiano foi avaliada através do diâmetro do halo de inibição em mm ao redor dos discos após 24h, 48h, 72h e 5 dias de incubação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.4.2 Testes *in vitro* sob cultura de bactérias

Para avaliação da capacidade inibitória dos filmes produzidos, cepas de bactérias *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923 foram disponibilizadas pelo Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, Campus de São Paulo. Para realização dos experimentos, os inóculos foram preparados a partir de 1 mL das culturas padrão dos micro-organismos (previamente descongeladas), as quais foram ativadas em 5 mL de caldo *Tryptona Soya Broth* (TSB- Oxoid) a 37°C em estufa bacteriológica por 24 horas, de acordo com as Normas Internacionais de

Biossegurança. A turbidez de crescimento ativo da suspensão bacteriana foi ajustada para concentração inicial de 8×10^8 UFC/mL, fornecida através da escala nefelométrica de *Mc Farland* onde a turvação e intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquido se manifesta por um aumento do número das bactérias.

Tanto para as cepas *E. coli* quanto *S. aureus*, foi escolhido o método teste de disco-difusão, no qual 50 µL da suspensão das bactérias testadas foram inoculadas em uma concentração final de 1×10^8 UFC/mL em placas de petri com dimensões 90 x 15 mm contendo 20 mL de Agar Infusão Cérebro - Coração (Brain Heart Infusion Agar - BHI Agar– Kasvi®, Paraná, Brasil), previamente preparado e esterilizado. Após o processo de preparação das placas com as cepas *E. coli* e *S. aureus*, cada linhagem de cepa bacteriológica foi dividida em quatro grupos, onde cada grupo aplicou-se três discos de 6 mm das membranas produzidas descritas na Tabela 3. Além disso, foram realizados experimentos nos quatro grupos de cada cepa realizando perfuração no ágar de três poços de 6 mm de diâmetro, que foram preenchidos com 60 µL da solução de preparo das membranas.

Para a avaliação da zona de inibição (ZI) do crescimento microbiano, utilizou-se imagens obtidas em câmera fotográfica e o software *Image J* (*National Institutes of Health, USA*), o qual foi utilizado para avaliação do diâmetro do halo de inibição (mm) formado ao redor dos poços, após 24 e 48 horas de incubação em estufa bacteriológica, à temperatura de 37°C.

4.5 TESTES *IN VITRO* SOB CULTURA DE FIBROBLASTOS

4.5.1 Linhagens celulares e condições de cultura

Células de fibroblastos derivadas de tecido conjuntivo de camundongos, da linhagem celular L929 (ATCC CCL-1 CTC), fornecida pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, Brasil, cultivadas em meio de cultura MEM (*Minimum Essential Medium*, Gibco™ - *Invitrogen Corporation*, Grand Island, EUA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco®, da Life Technologies) e 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco®, da *Life Technologies*), mantido em estufa e com atmosfera de 5% CO₂, a 37 °C foram utilizadas no experimento. A cada 2-3 dias, o meio de cultura era removido e as células mantidas em densidade subconfluentes até a sua utilização. Para todos

os experimentos, as células foram destacadas com solução de tripsina (0,25%)/ácido etilenodiaminotetracético (EDTA; 1 mM). Os reagentes da cultura celular foram adquiridos na *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EUA). Todos os procedimentos relacionados com a manutenção das células foram realizados em capela de fluxo laminar vertical, mantendo, assim, a esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas para o cultivo celular.

4.5.2 Atividade metabólica/viabilidade

As células foram plaqueadas em placa de cultivo de 48 poços (em triplicata) em uma densidade de 1×10^4 células/cm² contendo 500 µL de meio de cultura padrão, para a realização das análises da atividade metabólica. As membranas do estudo (QBMM, QBMM + cúrcuma, QAMM e QAMM + cúrcuma) nas dimensões de 6 mm foram colocadas em contato com o fundo do poço. As células foram cultivadas nos períodos experimentais de 24 e 72 horas. Após esses períodos, o teste de *AlamarBlue*® (*Thermo Fisher Scientific*, Brazil) foi realizado em todas as amostras. Para isso, o meio de cultura foi retirado e adicionado 500 µL da solução de *AlamarBlue*® a 10% em cada poço e incubada no escuro durante 3 h. Após esse período, 200 µL da solução foi analisada pela leitura da absorbância em 570 e 600 nm usando um espectrofotômetro de microplacas (*Bio-Tek Instruments*, EUA) em placas de 96 poços. A atividade metabólica foi calculada como uma porcentagem da redução do *AlamarBlue*® seguindo as instruções prévias do fabricante.

4.5.3 Ensaio da proliferação celular

As células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS), e tiveram 100 µL do PBS adicionado em cada poço que passaram por 2 ciclos de congelamento e descongelamento. Em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de quantificação do DNA avaliado pelo ensaio de *PicoGreen* (*QuantiFluor*® *dsDNA quantification kit*; *Promega*, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante e o sinal de fluorescência foi lido na excitação de 485/20 e emissão: 528/20.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram impostos estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvios-padrão. O teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para todas as variáveis. Para as análises microbiológicas, nos casos em que houve distribuição normal da amostra, as comparações entre os grupos foram feitas utilizando ANOVA One Way com *post hoc* de *Tukey*. Nos casos não paramétricos, o teste de *Kruskall-Wallis* com *post hoc* de *Dunn* foi adotado. Todas as análises foram realizadas no software *GraphPad Prism*, versão 6.01 (*GraphPad Software*, San Diego CA, EUA). Para os testes de atividade metabólica/viabilidade e proliferação celular foi utilizado testes de ANOVA *Two-Way* com *post hoc* de *Sidak*. Para as análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4.7 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Os resíduos gerados durante a realização dos ensaios microbiológicos foram autoclavados a 121°C por 20 min e descartados em sacos específicos para material biológico.

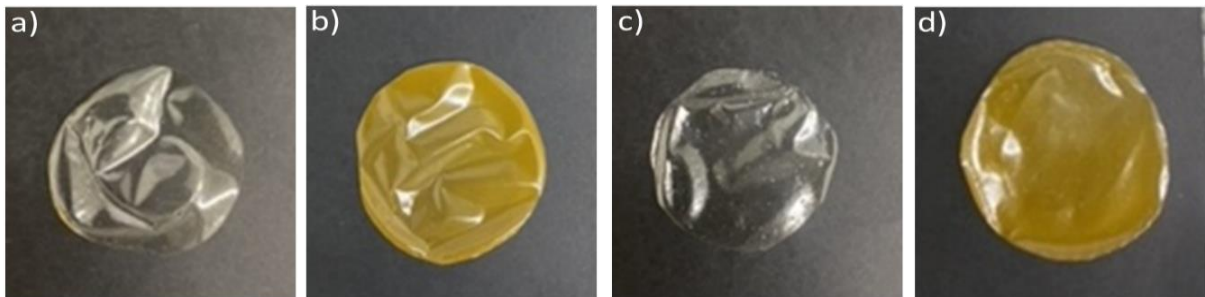
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

5.1.1 Formações das membranas

Após o período de secagem as membranas foram removidas das placas de silicone e mostraram-se homogêneas e autossustentáveis (conforme mostrado na Figura 6).

Figura 6- Membranas formadas por a) QBMM, b) QBMM + cúrcuma, c) QAMM e d) QAMM + cúrcuma, secas em temperatura ambiente, com fluxo de ar



Fonte: Autoria própria

Podemos observar que as membranas que contém cúrcuma apresentaram coloração amarelada. Apesar da coloração das membranas variarem significativamente de acordo com o bioativo utilizado, todas as membranas de quitosana apresentaram boa transparência à luz visível, além de flexibilidade e resistência mecânica quando tocadas. As diferenças observadas macroscopicamente na coloração das membranas são consequência das particularidades já existentes nas soluções poliméricas formadas por cada composição, sendo que a coloração amarelada é característica do pigmento curcumina.

5.1.2 Medidas de espessura

A Tabela 4 apresenta os valores médios de espessura e desvio padrão obtido para cada membrana produzida. Não houve diferença significativa entre os valores

de espessura encontrado para as membranas formadas por QBMM, QBMM + cúrcuma, QAMM e QAMM + cúrcuma.

Tabela 4- Medidas de espessura das membranas

Amostra	Média (triplicata)
Quitosana BMM	54 $\mu\text{m} \pm 8$
Quitosana BMM + Cúrcuma	46 $\mu\text{m} \pm 5$
Quitosana AMM	35 $\mu\text{m} \pm 5$
Quitosana AMM + Cúrcuma	56 $\mu\text{m} \pm 10$

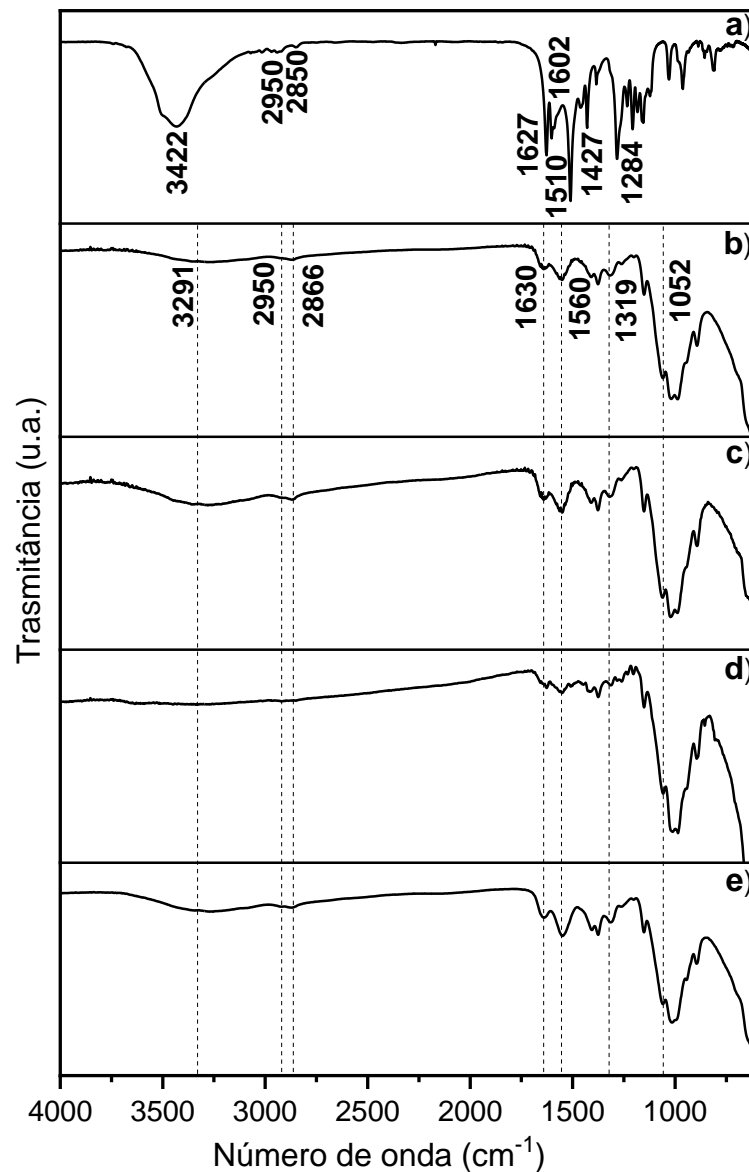
Fonte: Autoria própria

Os materiais candidatos a curativos devem apresentar espessuras que sejam compatíveis à da pele. O controle da espessura das membranas é importante para se avaliar a uniformidade desses materiais, a reprodutibilidade da medida de suas propriedades e a validade das comparações entre membranas. Segundo Ma et al. (2017), substitutos artificiais da pele são geralmente mais finos do que a derme humana. Constatou-se que todas as membranas preparadas nesse estudo possuem espessuras menores que a derme, podendo ser utilizadas no reparo tecidual.

5.1.3 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Espectros FTIR foram utilizados a fim de se caracterizar os grupos químicos de ambos os materiais nas membranas. Os espectros na região do infravermelho para as membranas, formadas por quitosana e membranas mistas, são mostrados na Figura 7.

Figura 7- Espectros de FTIR para a) cúrcuma e para membranas formadas por b) QBMM + cúrcuma, c) QBMM, d) QAMM + cúrcuma e e) QAMM



Fonte: Autoria própria

As bandas vibracionais típicas correspondentes aos grupos químicos formadores de ambos os materiais foram identificadas da seguinte forma: bandas em $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas a deformação de O-H sobrepostas a deformação N-H; em $2850\text{-}2970\text{ cm}^{-1}$ estão associados a vibrações de C-H; em 1630 cm^{-1} à banda de vibração relacionada ao grupo amida I (C = O alongamento) da quitosana; em 1560 cm^{-1} à banda de amida II (deformação angular N-H) da quitosana; em 1319 cm^{-1} à banda de amida III (C = O-NH₂ deformação axial) da quitosana; e em 1052 cm^{-1} observa-se uma banda correspondente à deformação angular do C-O da quitosana.

Todas as bandas foram atribuídas em acordo com a literatura e são características do espectro vibracional da quitosana, sendo que nenhuma banda nova foi observada (BRUGNEROTTO et al., 2001).

Já as bandas vibracionais referentes a cúrcuma, mostradas no espectro da Figura 6a, são: em 3422 cm^{-1} , alongando a vibração dos grupos-O-H; em 2950 cm^{-1} , vibração assimétrica dos grupos-CH₃-; em 2850 cm^{-1} , -CH₂ alongamento assimétrico; em 1627 cm^{-1} , alongamento da ligação C=O; em 1602 cm^{-1} , C-C vibração de ligação em aromáticos; em 1510 cm^{-1} , vibração de ângulo deformação do anel benzênico; em 1427 cm^{-1} , deformação angular do grupo CH₂; em 1284 cm^{-1} , deformação angular do grupo CH₃ e em 1118 cm^{-1} , estiramento das ligações C-O (DE DEUS et al., 2021). Entretanto, é possível observar que nenhuma banda referente a cúrcuma aparece no espectro das membranas que a contém, provavelmente devido à baixa proporção da cúrcuma em relação à massa da quitosana na formação da membrana, ou mesmo, a sobreposição da vibração das bandas para os dois materiais.

5.1.4 Ângulos de contato

As imagens e os valores do ângulo de contato das membranas estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5- Valores dos ângulos de contato entre a água e as membranas

<i>Membrana</i>	<i>Ângulo de contato médio</i>
<i>Quitosana BMM</i>	$102 \pm 0,6$
<i>Quitosana BMM + Cúrcuma</i>	$98 \pm 0,3$
<i>Quitosana AMM</i>	$95 \pm 1,5$
<i>Quitosana AMM + Cúrcuma</i>	$88 \pm 0,6$

Fonte: Autoria própria

A hidrofobicidade é um aspecto importante nas aplicações práticas de materiais bioativos, como por exemplo em sua aplicação como curativo de feridas. Um curativo deve ter a capacidade de manter um ambiente propício para cicatrização de feridas, impedindo o excesso de hidratação e acúmulo de exsudato (MA et al., 2017). Baseado nisso, a hidrofobicidade das membranas foi avaliada através da análise de ângulo de contato entre as membranas e a água. Para (LAW, 2014) se o ângulo de contato (θ)

é $\leq 90^\circ$ o material é considerado hidrofílico, hidrofóbico se $150^\circ \geq \theta > 90^\circ$ e superhidrofóbico se $180^\circ \geq \theta > 150^\circ$.

A membrana formada apenas por QBMM e QAMM apresentam valor de ângulo de contato médio de 102° e 95° , respectivamente, indicando característica hidrofóbica, apesar da presença dos grupos amino e hidroxila com caráter hidrofílico nas cadeias de quitosana. Já para as membranas que contém cúrcuma, foram obtidos valores de ângulo de contato médio de 98° e 88° , para membranas formadas por QBMM e QAMM respectivamente.

É possível verificar que há uma ligeira redução no valor do ângulo de contato com a adição de cúrcuma, sendo que a membrana formada por QAMM + cúrcuma apresenta valor considerado hidrofílico pela definição mostrada acima. Tal fato é provavelmente devido aos grupos hidroxilas (hidrofílicos) presentes na estrutura química da cúrcuma (Figura 2). Com base nos resultados de ângulo de contato, é possível afirmar que as membranas que contém cúrcuma são mais hidrofílicas do que as membranas de quitosana pura. Durante a realização dos experimentos, conforme a água era gotejada na superfície das membranas, uma pequena deformação na superfície do material pode ser observada, sugerindo forte interação entre os materiais.

Os resultados de hidrofiliidade encontrados nesse estudo, demonstram, portanto, que as membranas contendo cúrcuma sugerem ser mais adequadas para uso na reparação tecidual, pois apresentam maior afinidade com água e conseqüentemente, devam ser mais facilmente aderidas ao ambiente úmido de uma ferida. Tal requisito é necessário quando se trata da produção de membranas para uso como curativo ideal (MORGADO et al., 2014).

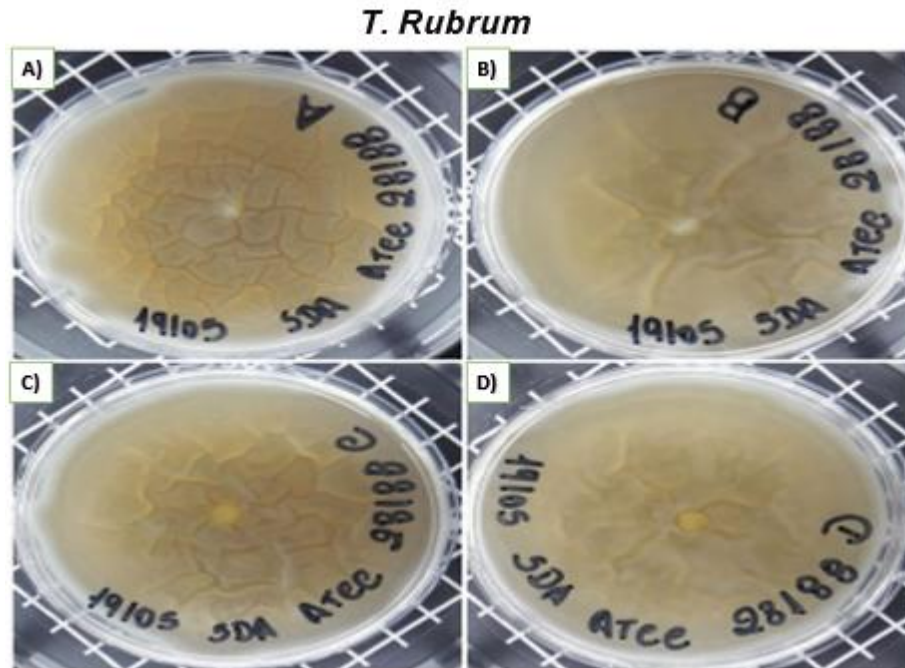
5.2 BIOATIVIDADE EM MICRO-ORGANISMOS

5.2.1 Experimentos em fungos

Testes microbiológicos foram realizados utilizando um disco de 6 mm das quatro membranas descritas na Tabela 3, no fungo *T. rubrum* ATCC 28188. A zona de inibição do crescimento microbiano foi avaliada através do diâmetro do halo de inibição em mm ao redor dos discos após 24h, 48h, 72h e 5 dias de incubação a $35 \pm$

1 °C. As membranas produzidas não apresentaram propriedades de inibição de crescimento nos fungos testados (Figura 8).

Figura 8- Imagens fotográficas das zonas de inibição nas membranas no fungo *T. rubrum*, A) QBMM, B) QAMM, C) QBMM + cúrcuma e D) QAMM + cúrcuma



Fonte: Autoria própria

A quitosana apresenta efeitos antifúngicos bem reportado na literatura. As evidências demonstram que seu mecanismo de ação está relacionado a características intrínsecas e extrínsecas do micro-organismo. O modo de apresentação, características estruturais e concentração utilizada deste polímero, são fatores extrínsecos que podem alterar a sua inibição microbiana (HOSSEINNEJAD; JAFARI, 2016; LIZARDI-MENDOZA; MONAL; VALENCIA, 2016; SAHARIAH; MÁSSON, 2017).

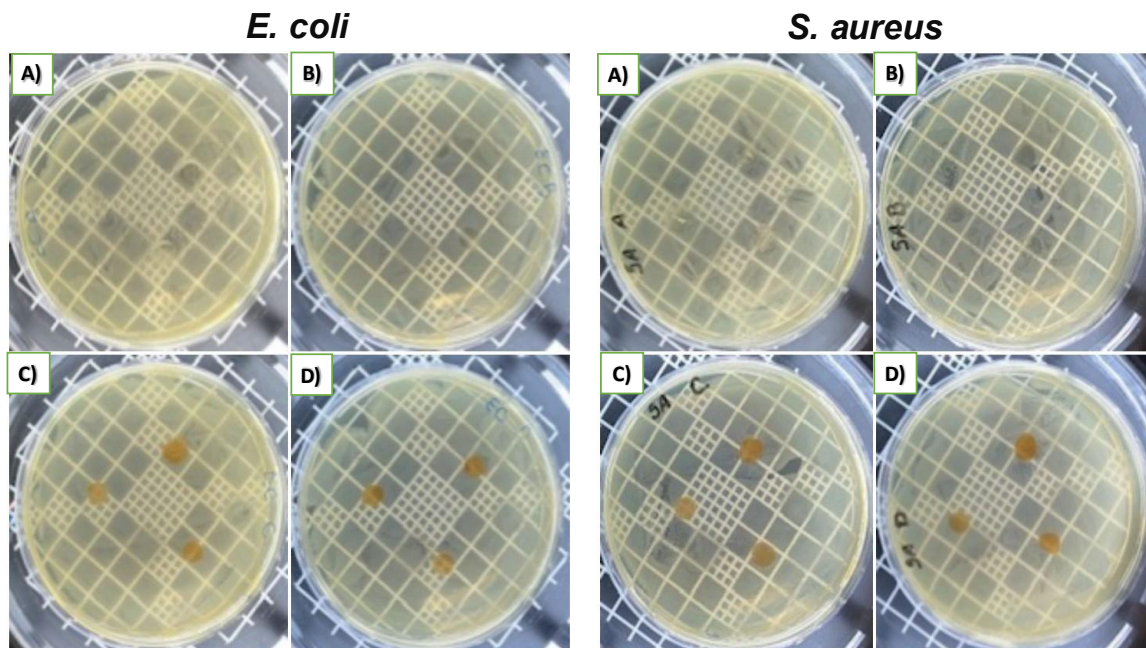
Embora os resultados demonstrem que as membranas de quitosana produzidas pelo método *casting*, testadas através do método de disco de fusão, não tenham inibido o crescimento do fungo *T. rubrum*, estudos realizados por Sajomsang et al. (2012), utilizando quitosana de diferentes massas molares na forma de solução, demonstrou atividade microbiana frente a vários fungos dermatófitos, incluindo o *T. rubrum*. Através dos resultados foi possível observar a dependência da massa molar com o efeito inibitório. Lopes e colaboradores (2017), também evidenciaram o

efeito inibitório da quitosana frente ao fungo *T.rubrum*, a depender da concentração utilizada e da massa molar, quando testada em soluções.

5.2.2 Experimentos em bactérias

Na avaliação da capacidade inibitória, cada linhagem de cepa de bactérias *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923, foi dividida em 4 grupos, onde inicialmente, em cada grupo, aplicou-se três discos de 6 mm das membranas produzidas descritas na Tabela 3. A zona de inibição do crescimento microbiano foi avaliada através do diâmetro do halo de inibição em mm ao redor dos discos após 24h e 48h de incubação a 37°C. As membranas produzidas não apresentaram propriedades de inibição de crescimento nas bactérias (Figura 9).

Figura 9- Imagens fotográfica das zonas de inibição das membranas nas bactérias *E. coli* e *S. aureus*, A) QBMM, B) QAMM, C) QBMM + cúrcuma e D) QAMM + cúrcuma



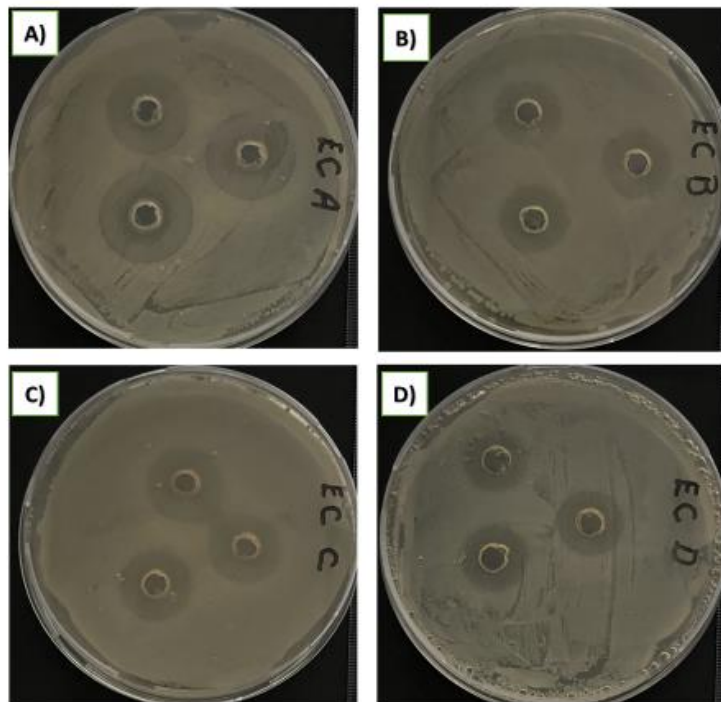
Fonte: Autoria própria

Posteriormente, ensaios microbiológicos foram realizados utilizando as soluções precursoras das membranas descritas na Tabela 3, para avaliação da capacidade inibitória de cada linhagem de cepa de bactérias *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923. Para tal, foram realizados experimentos nos quatro grupos de

cada cepa com a perfuração de três poços de 6 mm no Ágar, que foram preenchidos com 60 µL da solução de preparo dessas membranas.

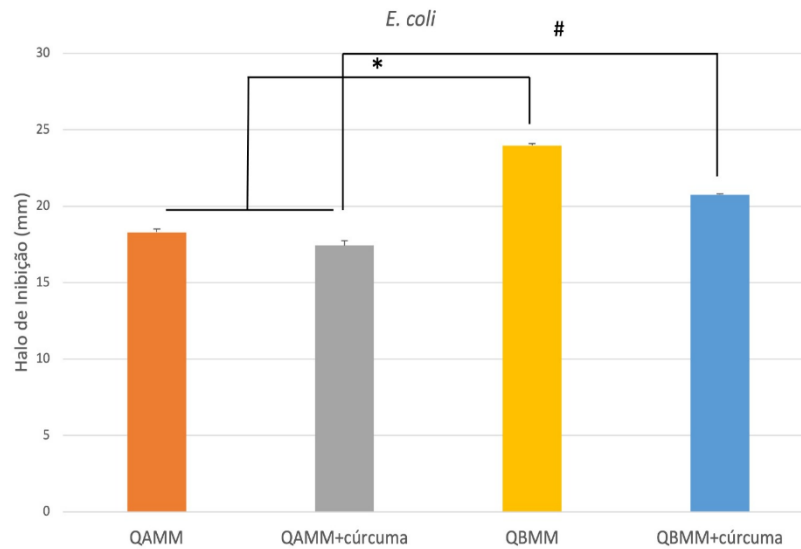
Para os testes realizados na bactéria *E. coli*, a presença de halos de inibição foi observada com os valores médios de $24 \pm 1,6$ mm, $18 \pm 0,4$ mm, $21 \pm 0,8$ mm e $17 \pm 1,1$ mm para as membranas formadas por QBMM, QAMM, QBMM + cúrcuma e QAMM + cúrcuma, respectivamente, conforme mostra a Figura 10. A análise estatística dos valores de zona de inibição mostrou que QBMM teve maior efeito inibitório quando comparado com a QAMM e QAMM + cúrcuma. Além disso, a QBMM + cúrcuma apresentou maior efeito de inibição quando comparado a QAMM + cúrcuma (Figura 11).

Figura 10- Imagens fotográficas das zonas de inibição das soluções precursoras das membranas na bactéria *E. coli*, A) QBMM, B) QAMM, C) QBMM + cúrcuma e D) QAMM e cúrcuma



Fonte: Autoria própria

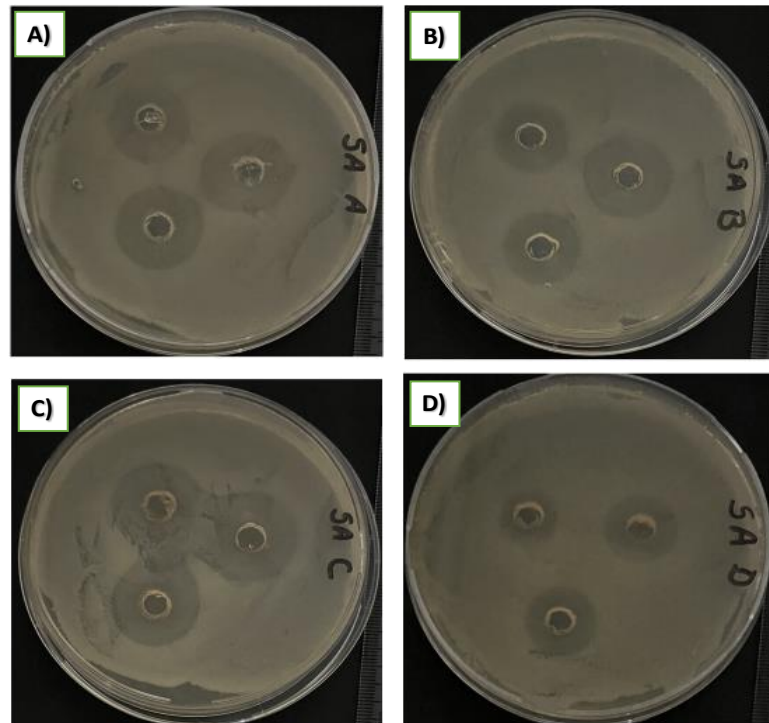
Figura 11- Análises estatísticas entre os grupos na bactéria *E. coli*



Fonte: Autoria própria

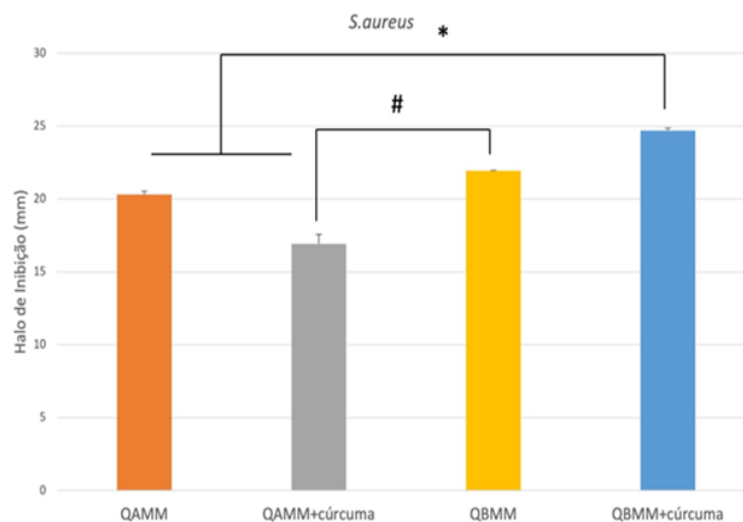
Para os testes realizados na bactéria *S. aureus*, a presença de halos de inibição também foi observada com os valores médios de $22 \pm 0,5$ mm, $21 \pm 1,7$ mm, $25 \pm 0,5$ mm e $17 \pm 2,6$ mm para as membranas formadas por QBMM, QAMM, QBMM + cúrcuma e QAMM + cúrcuma, respectivamente, conforme mostra a Figura 12. A análise estatística dos valores de zona de inibição mostrou que QBMM teve maior efeito inibitório quando comparado com QAMM + cúrcuma e que QBMM + cúrcuma apresentou maior efeito de inibição quando comparado a QAMM e QAMM + cúrcuma (Figura 13).

Figura 12- Imagens fotográficas das zonas de inibição das soluções precursora das membranas na bactéria *S. aureus*, A) QBMM, B) QAMM, C) QBMM + cúrcuma e D) QAMM + cúrcuma



Fonte: Autoria própria

Figura 13- Análises estatísticas entre os grupos na bactéria *S. aureus*



Fonte: Autoria própria

Embora as membranas produzidas pela técnica de *casting* não tenham apresentado efeito inibitório nas bactérias, quando testadas através de disco de fusão,

foi possível verificar que durante o teste com soluções o agente antimicrobiano difundiu-se pelo meio e atuou negativamente sobre o crescimento dos microorganismos, os quais são visualmente identificados pelo aparecimento de uma área em volta do poço contendo as soluções, onde as cepas não se desenvolveram, apresentando o halo de inibição (Figuras 10 e 12).

Na bactéria *E. coli*, tanto a QBMM quanto a QBMM + cúrcuma apresentaram maior efeito inibitório que as membranas que possuíam alta \overline{MM} de quitosana pura e associada a cúrcuma. Não houve diferença estatística significativa quando comparado o efeito inibitório entre QBMM e QBMM + cúrcuma. Esses resultados corroboram com estudos realizados por Bano et al. (2017), Laokuldilok et al. (2017) e Younes et al. (2014), onde soluções de quitosana com \overline{MM} variável foram investigadas contra *E. coli* e foi verificado efeito inibitório, sendo que a atividade antibacteriana aumentou com a diminuição da \overline{MM} , verificando maior inibição promovida pelas quitosanas de baixa \overline{MM} .

Na bactéria *S. aureus*, também foi observado que a QBMM e a QBMM + cúrcuma apresentaram maior efeito inibitório que as demais membranas, sem diferença estatisticamente significativa quando comparado o efeito inibitório entre as duas. Os resultados do estudo realizado por Bano e colaboradores (2017) demonstraram consonância com a presente pesquisa, pois ao mensurar resultados, destacaram o maior efeito antimicrobiano nas quitosanas de baixa massa molar quando aplicados em *S. aureus*, onde quitosanas de baixa \overline{MM} (801, 473 e 259 g/mol) exibiram maior atividade antibacteriana. Nesse estudo, dentre as amostras de baixa \overline{MM} utilizadas, quanto menor a \overline{MM} da quitosana maior foi o efeito inibitório observado.

Os resultados mostraram uma forte dependência dos índices de inibição com a \overline{MM} da quitosana. De fato, todas as hipóteses de ação da quitosana são principalmente relacionadas com a interação entre as cargas positivas dos grupos amino protonados da quitosana e cargas negativas presentes na membrana/parede celular de bactérias e fungos. Diferenças na \overline{MM} levaram a diferentes tipos de interação com a célula, levando a diferentes mecanismos de ação, o que pode estar relacionado com os diferentes efeitos inibitórios apresentados no trabalho (DOTTO; VIEIRA; PINTO, 2015; GARCIA et al., 2018, 2020; KAYA; ASAN-OZUSAGLAM; ERDOGAN, 2016; KULIKOV et al., 2014).

A maior inibição das quitosanas de menor \overline{MM} pode estar relacionada com uma melhor interação com a membrana e/ou parede celular, o que pode ser proporcionado justamente pelo menor tamanho da cadeia polimérica quando utilizada em forma de solução. Uma hipótese é que as quitosanas com cadeias poliméricas de baixa \overline{MM} conseguem penetrar mais facilmente nas células microbianas e causam a inibição de várias enzimas, interrompem a síntese de proteínas, ligam-se ao DNA, inibindo assim a síntese de mRNA, causando distúrbios no metabolismo desses micro-organismos (KONG et al., 2010; KULIKOV et al., 2019; KIM, 2015).

Além disso, muitas propriedades físico-químicas e funcionais de uma cadeia polimérica são definidas pela sua massa molar média. Uma propriedade bastante influenciada por essa característica é a solubilidade, propriedade esta que está diretamente ligada a atividade antimicrobiana do polímero (CARDOSO; SIGNINI; CAMPANA-FILHO., 2001; MATICA et al., 2019). De modo geral, quanto menor a \overline{MM} , menor o empacotamento das cadeias e, conseqüentemente, maior a sua solubilidade (ZAGAR; ASGHARI; DASHTI., 2016).

A infecção de feridas é a maior causa para a sua cronicidade, uma vez que as infecções persistentes param o crescimento do tecido de reparação como também modificam a resposta inflamatória (GANESH et al., 2014). Isso mostra a importância de que materiais com atividade antimicrobiana sejam utilizados no processo de reparo tecidual, como é o caso das membranas aqui produzidas, candidatas a curativos.

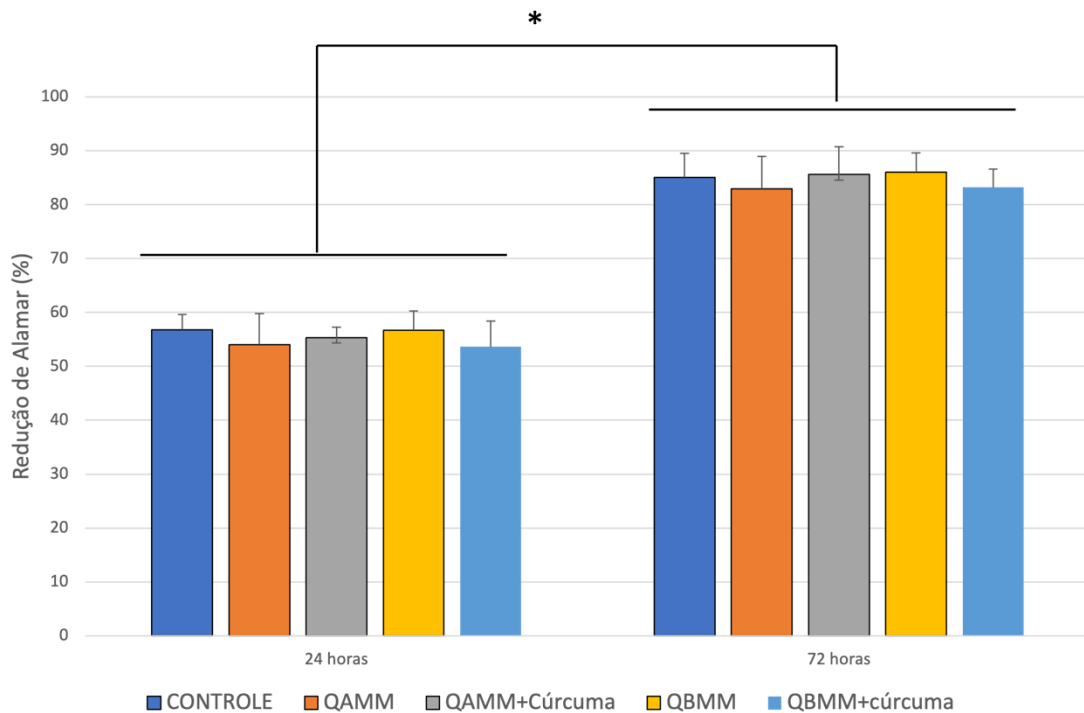
5.3 BIOATIVIDADE SOB CULTURA DE FIBROBLASTOS

5.3.1 Atividade metabólica/viabilidade

A Figura 14 representa o ensaio de atividade metabólica (viabilidade celular) realizada pelo ensaio de *AlamarBlue*® após o período de cultivo de 24 e 72 horas de células L929 em contato com as diferentes membranas.

Após 24 horas de cultivo, não foi observada diferença estatística significativa entre as membranas estudadas. Entretanto, após 72 horas de cultivo celular, todas as membranas apresentaram aumento da viabilidade celular, quando comparados com o período experimental de 24 horas ($p < 0,0001$). Nenhuma diferença adicional foi observada entre as membranas avaliadas.

Figura 14- Gráfico de redução do *AlamarBlue* de células L929 no período de 24 e 72 horas



Fonte: Autoria própria

Os fibroblastos são as principais e mais numerosas células envolvidas no processo de cicatrização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) e estudos *in vitro* nessas células são realizados para avaliar a bioatividade e compatibilidade (não-toxicidade) de materiais utilizados em reparação tecidual.

Assim, os testes *in vitro*, realizados em subcultura de fibroblastos avaliaram a citotoxicidade através do ensaio realizado pelo *Alamar Blue*[®], reagente de ensaio de viabilidade celular que contém um indicador azul fluorescente (corante resazurina) para monitorizar a viabilidade de células utilizando um leitor de microplacas de fluorescência. Os resultados indicam que as membranas produzidas não apresentaram toxicidade para a cultura de células de fibroblastos, demonstrando viabilidade para o crescimento da cultura, sugerindo viabilidade para testes *in vivo* (na pele).

Os testes de citotoxicidade são fundamentais na determinação da toxicidade potencial de uma substância de teste. Toxicidade mínima ou nenhuma é essencial para o desenvolvimento bem-sucedido de uma preparação farmacêutica e, a esse

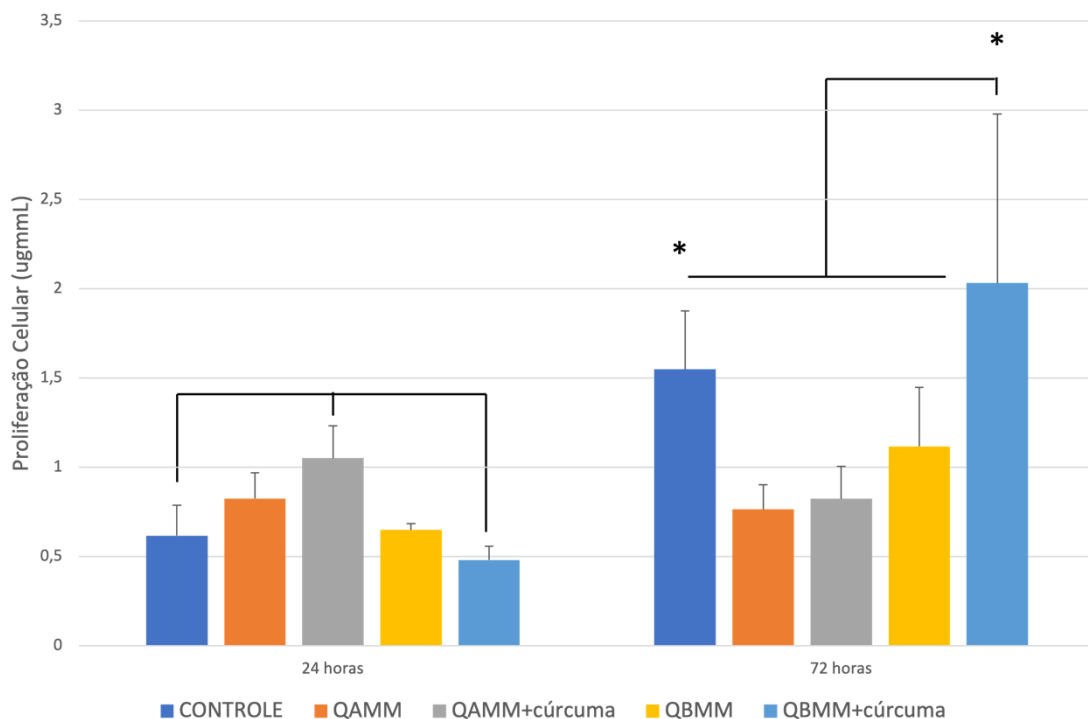
respeito, os estudos de toxicidade celular desempenham um papel crucial na construção de um biomaterial. Inúmeras pesquisas demonstram que polímeros como a quitosana e compostos como a cúrcuma não causam citotoxicidade às células de fibroblastos (KLOESCH et al., 2016; SUETH-SANTIAGO et al.,2016).

5.3.2 Proliferação celular

Os resultados da análise referente à proliferação celular da linhagem L929 do ensaio de *Picogreen* após o cultivo de 24 e 72 horas em contato com as membranas estão mostrados na Figura 15. No período de 24 horas foi observado um aumento da proliferação celular no grupo QAMM + cúrcuma quando comparado ao grupo controle ($p = 0,042$) e QAMM + cúrcuma ($p = 0,005$).

Já no período de 72 horas foi observado um aumento significativo da proliferação celular no grupo controle ($p < 0,001$) e do grupo QBMM + cúrcuma ($p < 0,001$) quando comparado ao período de 24 horas. Ademais, a maior proliferação foi detectada no grupo QBMM + cúrcuma ($p < 0,0001$) quando comparado aos demais grupos experimentais.

Figura 15 - Gráfico da proliferação das células L929 do ensaio *Picogreen* no período de 24 e 72 horas



Fonte: Autoria própria

Os resultados para os testes de proliferação em cultura celular, indicam maior proliferação celular de fibroblastos para membranas de quitosana de baixa massa molar + cúrcuma em comparação com as outras membranas no período de 72hs. Tais resultados sugerem que essas membranas são as que mais favorecem o processo de reparação, já que os fibroblastos têm um papel fundamental no reparo tecidual.

Chen e colaboradores (2002), utilizaram quitosanas de diferentes massas molares para avaliação *in vitro* em fibroblastos. As quitosanas promoveram significativamente a proliferação de fibroblastos, sendo que a quitosana de menor massa molar teve atividades mais significativas. Outros estudos também demonstraram dependência da massa molar com a proliferação de fibroblastos, sendo que as quitosanas de menor massa molar de quitosana promoveram mais o crescimento de células da pele humana do que os demais (KINGKAEW et al., 2014).

Trabalhos realizados por Ribeiro et al. (2021), em estudos modelo animal, para investigação da reação inflamatória produzidas por membranas de quitosana de diferentes massas molares, também concluíram que as quitosanas de baixa massa molar levam a uma redução prévia da resposta inflamatória e a uma melhor regeneração tecidual.

6 CONCLUSÕES

Membranas autossustentáveis à base de quitosana foram produzidas e caracterizadas. Tais membranas não apresentaram atividade antimicrobiana frente ao fungo *T. rubrum* e as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, porém, as soluções formadoras dessas apresentaram potencial antimicrobiano nos testes em bactérias, sendo que as amostras de quitosana de baixa massa molar e quitosana de baixa massa molar mais cúrcuma, apresentaram maior efeito inibitório. Assim, verificou-se que a \overline{MM} do polímero é uma característica importante na determinação da sua ação.

As membranas produzidas não apresentaram efeito citotóxico, ao modo que induziram o aumento da proliferação celular. A quitosana de baixa massa molar + cúrcuma levou a uma maior proliferação celular.

Desta forma, acredita-se que as membranas de quitosana de baixa massa molar + cúrcuma possuam aspectos importantes que sobressaem as demais membranas testadas para futuros testes *in vivo*, visando aplicações de materiais como curativos de feridas, devido apresentarem maior efeito na proliferação celular e no efeito inibitório das *S. aureus* e *E. coli*, bactérias prevalentes em infecções de pele. Outra característica importante para aplicações *in vivo*, é o fato de que essa membrana apresentou caráter mais hidrofílico quando comparado com a QBMM, sendo mais favorável para aplicação em ambiente úmido, como o de uma ferida.

Os resultados do presente estudo mostram potencial para o desenvolvimento de um biomaterial que possibilita auxiliar o processo de reparação tecidual. Seu desenvolvimento e estudo das diferentes massas molares da quitosana, incrementam a seletividade para eficácia do polímero, favorecendo a fabricação e sua utilização de forma otimizada. No entanto, alguns desafios ainda precisam ser superados a fim verificar a melhor forma de apresentação da quitosana visando aplicações práticas no reparo tecidual. Como exemplo, a realização de testes microbiológicos com as membranas em culturas de fungos e bactérias utilizando outras metodologias é desejável, afim de definir se a produção de membranas através do método de *casting* é a melhor opção no desenvolvimento de um biomaterial a ser utilizado no reparo tecidual.

REFERÊNCIAS

- ADAHOUN, M. A. et al. Enhanced anti-cancer and antimicrobial activities of curcumin nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 45, n. 1, p. 98–107, 2017.
- ADAMCZAK, A.; OŻAROWSKI, M.; KARPIŃSKI, T. M. Curcumin, a natural antimicrobial agent with strain-specific activity. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 7, p. 1–12, 2020.
- AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 2009.
- AHMADI, B. et al. Phylogenetic analysis of dermatophyte species using DNA sequence polymorphism in calmodulin gene. **Medical Mycology**, v. 54, n. 5, p. 500–514, 2016.
- BARRETO CARDOSO, Márcia; SIGNINI, Roberta; CAMPANA-FILHO, Sérgio Paulo. On the sonication of chitin: effects on its structure and morphology and influence on its deacetylation. **Polymer Bulletin**, v. 47, p. 183-190, 2001.
- AHSAN, R. et al. A Comprehensive Review on Physiological Effects of Curcumin. **Drug Research**, v. 70, n. 10, p. 441–447, 1 out. 2020.
- BADAWY, M. E. I.; RABEA, E. I. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 51, n. 1, p. 110–117, 2009.
- BANO, I. et al. Bioactivity of Variant Molecular Weight Chitosan Against Drug-Resistant Bacteria Isolated from Human Wounds. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 8, p. 958–965, 2017.
- BARCHITTA, M. et al. Nutrition and wound healing: An overview focusing on the beneficial effects of curcumin. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, 2019.

- BONTEMS, O. et al. Epidemiology of dermatophytoses in switzerland according to a survey of dermatophytes isolated in Lausanne between 2001 and 2018. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, p. 1–8, 2020.
- BRUGNEROTTO, J. et al. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569-3580, 2001.
- CAFARCHIA, C. et al. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infection, Genetics and Evolution*. **Elsevier**, 2013.
- CAMPANA-FILHO, S. P. et al. Extração, estruturas e propriedades de de alfa e beta-quitina. **Química Nova**, v. 30, p. 644-650, 2007.
- CANELLA, K. M.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel-influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, p. 13-17, 2001.
- CASADIDIO, C. et al. Chitin and chitosans: Characteristics, eco-friendly processes, and applications in cosmetic science. **Marine drugs**, v. 17, n. 6, p. 369, 2019.
- CHANG, S. H. et al. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 74–81, 2015.
- CHEN, Xi-Guang et al. The effect of carboxymethyl-chitosan on proliferation and collagen secretion of normal and keloid skin fibroblasts. **Biomaterials**, v. 23, n. 23, p. 4609-4614, 2002.
- CIESIELSKA, A. et al. Metabolomic analysis of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* during keratin degradation. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.
- DAI, C. et al. Polymyxins–curcumin combination antimicrobial therapy: Safety implications and efficacy for infection treatment. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 506, 2020.
- DOMANSKY, R.; BORGES, E. L. Manual para prevenção de lesões de pele: recomendações baseadas em evidências. Editora Rubio, 2014.

DE DEUS, W. F. et al. Curcuminoid-Tailored Interfacial Free Energy of Hydrophobic Fibers for Enhanced Biological Properties. **ACS Applied Materials and Interfaces**, 2021.

DE OLIVEIRA SOUZA, C. et al. Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 7, p. 1–2, 2016.

DIASTUTI, H.; ASNANI, A.; CHASANI, M. Antifungal activity of curcuma xanthorrhiza and curcuma soloensis extracts and fractions. **In: IOP conference series: materials science and engineering**. IOP Publishing, 2019.

DOTTO, G. L.; VIEIRA, M. L. G.; PINTO, L. A. A. Use of chitosan solutions for the microbiological shelf life extension of papaya fruits during storage at room temperature. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 126–130, 2015.

EL KNIDRI, H. et al. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. **International journal of biological macromolecules**, v. 120, p. 1181-1189, 2018.

ELAVARASHI, E.; KINDO, A. J.; RANGARAJAN, S. Enzymatic and non-enzymatic virulence activities of dermatophytes on solid media. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 2, p. DC23–DC25, 2017.

FERREIRA, F. D. et al. Inhibitory effect of the essential oil of Curcuma longa L. and curcumin on aflatoxin production by Aspergillus flavus Link. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 789–793, 2013.

FERREIRA-NOZAWA, M. S. et al. The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of Trichophyton rubrum on human nail in vitro. **Medical Mycology**, v. 44, n. 7, p. 641–645, 2006.

GABRIEL, J. D. S.; TIERA, M. J.; TIERA, V. A. D. O. Synthesis, Characterization, and Antifungal Activities of Amphiphilic Derivatives of Diethylaminoethyl Chitosan against Aspergillus flavus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 24, p. 5725–5731, 2015.

GANESH, P.; KUMAR, R. Suresh; SARANRAJ, P. Phytochemical analysis and antibacterial activity of Pepper (Piper nigrum L.) against some human pathogens. **Central European Journal of Experimental Biology**, v. 3, n. 2, p. 36-41, 2014.

GARCIA, L. G. S. et al. Effect of the molecular weight of chitosan on its antifungal activity against *Candida* spp. in planktonic cells and biofilm. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, p. 662–669, 2018.

GARCIA, L. G. S. et al. Antifungal activity of different molecular weight chitosans against planktonic cells and biofilm of *Sporothrix brasiliensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 341–348, 2020.

GOY, R. C.; BRITO, D. DE; ASSIS, O. B. G. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. **Polímeros**, v. 19, p. 241–247, 2009.

HADDAD, M.; SAUVAIN, M.; DEHARO, E. **Curcuma as a parasitocidal agent: A review**. **Planta Medica**, 2011.

HAMED, I.; ÖZOGUL, F.; REGENSTEIN, J. M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. **Trends in food science & technology**, v. 48, p. 40-50, 2016.

HEMBACH, L.; CORD-LANDWEHR, S.; MOERSCHBACHER, B. M. Enzymatic production of all fourteen partially acetylated chitosan tetramers using different chitin deacetylases acting in forward or reverse mode. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

HEWLINGS, S. J.; KALMAN, D. S. Curcumin: A review of its effects on human health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 92, 2017.

HOSSEINNEJAD, M.; JAFARI, S. M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. **International journal of biological macromolecules**, v. 85, p. 467-475, 2016.

HOWLING, G. I. et al. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. **Biomaterials**, v. 22, n. 22, p. 2959-2966, 2001.

HUSSAIN, A.; ATRAY, D. Antibacterial Activity of Ethanolic Extract of *Curcuma longa* on Human Pathogens and Antibiotics Pattern. **World Wide Journals**, v. 11, n. 12, 2022.

ISLAM, S.; BHUIYAN, M. A. R.; ISLAM, M. N. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 25, p. 854-866, 2017.

JOSEPH, S. M. et al. A review on source-specific chemistry, functionality, and applications of chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, p. 100036, 2021.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Unter Berücksichtigung der Histofysiologie**. Springer-Verlag, 2013.

KAYA, M.; ASAN-OZUSAGLAM, M.; ERDOGAN, S. Comparison of antimicrobial activities of newly obtained low molecular weight scorpion chitosan and medium molecular weight commercial chitosan. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 6, p. 678–684, 2016.

KIERSZENBAUM, A. L. *Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia*. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, p. 449-474, 2004.

KIM, S. K.; RAJAPAKSE, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n. 4, p. 357–368, 2005.

KINGKAEW, Jeerun et al. Effect of molecular weight of chitosan on antimicrobial properties and tissue compatibility of chitosan-impregnated bacterial cellulose films. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 534-544, 2014.

KLOESCH, Burkhard et al. In vitro study of a liposomal curcumin formulation (Lipocurc™): Toxicity and biological activity in synovial fibroblasts and macrophages. *in vivo*, v. 30, n. 4, p. 413-419, 2016.

KONG, M. et al. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 65, n. 2, p. 197–202, 2008.

KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

KOU, S. G.; PETERS, L. M.; MUCALO, M. R. Chitosan: A review of sources and preparation methods. *International Journal of Biological Macromolecules*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 85-94, 2021.

KRAVANJA, G. et al. Chitosan-based (Nano)materials for Novel Biomedical Applications. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1960, 2019.

KULIKOV, S. N. et al. Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: Molecular weight-activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 169–178, 2014.

LAOKULDILOK, T. et al. Physicochemical, antioxidant, and antimicrobial properties of chitooligosaccharides produced using three different enzyme treatments. **Food Bioscience**, v. 18, p. 28–33, 2017.

LAW, K. Y. Definitions for hydrophilicity, hydrophobicity, and superhydrophobicity: Getting the basics right. *Journal of Physical Chemistry Letters*. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 5, n. 4, p. 686-688, 2014.

LEE, W. J. et al. Increasing prevalence of *Trichophyton rubrum* identified through an analysis of 115,846 cases over the last 37 years. **Journal of Korean Medical Science**, v. 30, n. 5, p. 639–643, 2015.

LI, X. FANG et al. Chitosan kills *Escherichia coli* through damage to be of cell membrane mechanism. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 3, p. 493–499, 2010.

LI, Z.; YANG, F.; YANG, R. Synthesis and characterization of chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 378–387, 2015.

LIU, B. et al. Synthesis, characterization of catechin-loaded folate-conjugated chitosan nanoparticles and their anti-proliferative effect. **CYTA - Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 868–876, 2018.

LIZARDI-MENDOZA, J.; ARGÜELLES MONAL, W. M.; GOYCOOLEA VALENCIA, F. M. Chemical characteristics and functional properties of chitosan. In: **Chitosan in the preservation of agricultural commodities**. Academic Press, 2016.

LOPES, Ana I.; TAVARIA, Freni K.; PINTADO, Manuela E. Application of chitosan in the control of fungal infections by dermatophytes. *Annals of Applied Microbiology and Biotechnology Journal*, 2017.

MA, Y. et al. Chitosan membrane dressings toughened by glycerol to load antibacterial drugs for wound healing. ***Materials Science and Engineering C***, v. 81, p. 522–531, 2017.

MACEDO, J. B. et al. Atividade antimicrobiana de quitosanas e seus derivados: Influência das características estruturais. ***Química Nova***, v. 45, p. 690-704, 2022.

MACÊDO, M. D. O. C. DE. Efeito do Tratamento por Plasma na Proliferação de Fibroblastos e Esterilização de Membranas de Quitosana. 2013. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN.

MATICA, Mariana Adina et al. Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 23, p. 5889, 2019.

MACHADO, B. R. et al. Bactericidal pectin/chitosan/glycerol films for food pack coatings: A critical viewpoint. ***International Journal of Molecular Sciences***, v. 21, n. 22, p. 1–19, 2020.

MADUREIRA, A. R. et al. Production of antimicrobial chitosan nanoparticles against food pathogens. ***Journal of Food Engineering***, v. 167, p. 210–216, 2015.

MALHEIROS, P. S. et al. Acid and thermal resistance of a *Salmonella* Enteritidis strain involved in several foodborne outbreaks. ***Journal of food safety***, v. 29, n. 2, p. 302-317, 2009.

MAO, X. et al. Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: A review. ***Journal of Cleaner Production***, v. 143, p. 814-823, 2017.

MARAKI, S.; MAVROMANOLAKI, V. E. Epidemiology of onychomycosis in Crete, Greece: a 12-year study. ***Mycoses***, v. 59, n. 12, p. 798–802, 2016.

MARANHÃO, F. C. A. et al. Isolation of transcripts overexpressed in the human pathogen *Trichophyton rubrum* grown in lipid as carbon source. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 333–338, 2011.

MARQUES, C. et al. How the lack of chitosan characterization precludes implementation of the safe-by-design concept. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 165, 2020.

MARTINS, A. F. et al. Chitosan/iota-carrageenan and chitosan/pectin polyelectrolyte multilayer scaffolds with antiadhesive and bactericidal properties. **Applied Surface Science**, v. 502, 2020.

MELLEGÅRD, H. et al. Antibacterial activity of chemically defined chitosans: Influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 48–54, 2011.

METHACANON, P. et al. Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, n. 2, p. 119-123, 2003.

MORGADO, Patrícia I. et al. Membranas assimétricas de poli (álcool vinílico)/quitosana: Morfologia altamente controlada para o curativo ideal. **Journal of membrana science**, v. 262-271, 2014.

MORI, T. et al. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. **Biomaterials**, v. 18, n. 13, p. 947-951, 1997.

MUNIR, Z. et al. Exploitation of the antibacterial properties of photoactivated curcumin as 'green' tool for food preservation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2600, 2022.

MUÑOZ, I. et al. Life cycle assessment of chitosan production in India and Europe. **International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 23, n. 5, p. 1151–1160, 2018.

MUXIKA, A. et al. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 105, p. 1358-1368, 2017.

NAWAS, T. Antibacterial activity of curcumin against Lebanese clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **MOJ Toxicology**, v. 4, n. 2, 2018.

- NEYESTANI, Z. et al. Review of anti-bacterial activities of curcumin against *Pseudomonas aeruginosa*. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 29, n. 5, 2019.
- NGUYEN, T. T. et al. Application and optimization of the highly efficient and environmentally-friendly microwave-intensified lactic acid demineralization of deproteinized Rock lobster shells (*Jasus edwardsii*) for chitin production. **Food and Bioproducts Processing**, v. 102, p. 367–374, 2017.
- OLIVEIRA, I. de M. et al. Wound healing: stages and influencing factors. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 6, n. 4, p. 267-271, 2012.
- PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A. et al. The relationship between *Candida* species charge density and chitosan activity evaluated by ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 31, p. 3749–3751, 2011.
- PARHAM, S. et al. Antioxidant, antimicrobial and antiviral properties of herbal materials. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1309, 2020.
- PAUL, S.; MOHANRAM, K.; KANNAN, I. Antifungal activity of curcumin-silver nanoparticles against fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida* species. **AYU (An international quarterly journal of research in Ayurveda)**, v. 39, n. 3, p. 182, 2018.
- PAUL, W. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. **Trends Biomater Artif Organs**, v. 18, n. 1, p. 18-23, 2004.
- PERES, T. A. N. et al. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 85, p. 657-667, 2010.
- QIU, M. et al. Effect of chitosan and its derivatives as antifungal and preservative agents on postharvest green asparagus. **Food Chemistry**, v. 155, p. 105–111, 2014.
- R GROBLER, S. Cytotoxicity of Low, Medium and High Molecular weight Chitosan's on Balb/c 3T3 Mouse Fibroblast Cells at a 75-85% De-acetylation Degree. **Material Science and Engineering with Advanced Research**, v. 2, n. 2, p. 27–30, 2018.

R., N. et al. Enhanced wound healing by PVA/Chitosan/Curcumin patches: In vitro and in vivo study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 182, 2019.

RADULY, F. M. et al. Curcumin: Modern applications for a versatile additive. **Coatings**, 2021.

RAI, N. et al. Synthesized Silver Nanoparticle Loaded Gel of Curcuma Caesia for Effective Treatment of Acne. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 10, n. 6- s, p. 75–82, 2020.

RIAZ RAJOKA, M. S. et al. Chitosan and its derivatives: synthesis, biotechnological applications, and future challenges. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, p. 1557-1571, 2019.

RIBEIRO, José Carlos Viana et al. The effects of the molecular weight of chitosan on the tissue inflammatory response. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 109, n. 12, p. 2556-2569, 2021.

ROCHA, L. F. et al. Epidemiological profile of cutaneous superficial mycoses in South, Brazil. **Scientific Electronic Archives. Sinop**. Vol. 11, no. 2, p. 133-137, 2018.

ROSALIE, S. et al. Epidemiology of Dermatophytes in Belgium: A 5 Years' Survey. **Mycopathologia**, v. 186, n. 3, p. 399–409, 2021.

ROUZAUD, C. et al. Severe dermatophytosis and acquired or innate immunodeficiency: A review. **J Fungi**, 2016.

SAHARAN, V. et al. Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 677–683, 2013.

SAHARIAH, P.; MÁSSON, M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: A review of the structure–activity relationship. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 11, p. 3846-3868, 2017.

SAJOMSANG, Warayuth et al. Antifungal property of quaternized chitosan and its derivatives. **International journal of biological macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 263-269, 2012.

SARDI, J. C. O. et al. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SEVERINO, R. et al. Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium on green beans. **Food Control**, v. 50, p. 215–222, 2015.

SEYFARTH, F. et al. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-d-glucosamine against Candida albicans, Candida krusei and Candida glabrata. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, n. 1–2, p. 139–148, 2008.

SHEN, J. J. et al. The emerging terbinafine-resistant Trichophyton epidemic: What is the role of antifungal susceptibility testing?. **Dermatology**, v. 238, n. 1, p. 60-79, 2022.

SHI, Z. et al. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, v. 27, n. 11, p. 2440–2449, 2006.

SHOME, S. et al. Curcumin as potential therapeutic natural product: a nanobiotechnological perspective. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 12, p. 1481-1500, 2016.

SILVA, H. S. R. C.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química nova**, v. 29, p. 776-785, 2006.

SILVA-ROCHA, W. P.; DE AZEVEDO, M. F.; CHAVES, G. M. Épidémiologie et distribution des espèces fongiques des mycoses superficielles dans le Nord-est du Brésil. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 1, p. 57–64, 2017.

SONG, X. et al. Molecular targets of curcumin in breast cancer (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 1, p. 23–29, 2019.

SUETH-SANTIAGO, Vitor et al. The effectiveness of natural diarylheptanoids against Trypanosoma cruzi: Cytotoxicity, ultrastructural alterations and molecular modeling studies. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0162926, 2016.

TAMARA, F. R. et al. Antibacterial effects of chitosan/cationic peptide nanoparticles. **Nanomaterials**, v. 8, n. 2, 2018.

TANG, C. H. Nanocomplexation of proteins with curcumin: From interaction to nanoencapsulation (A review). **Food Hydrocolloids**, v. 109, p. 106106, 2020.

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

TEOW, S. Y. et al. Antibacterial action of curcumin against *Staphylococcus aureus*: a brief review. **Journal of tropical medicine**, v. 2016, 2016.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.

UL-ISLAM, M. et al. Chitosan-based Nanostructured Biomaterials: Synthesis, Properties, and Biomedical Applications. **Advanced Industrial and Engineering Polymer Research**, 2023.

VALDÉS, M. Á. S. Microbial resistance in the current context and the importance of knowledge and application in antimicrobial policy. **Revista Habanera de Ciencias Médicas**, v. 16, n. 3, p. 402-419, 2017.

VENA, G. A. et al. Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. **Microbiologica-Quarterly Journal of Microbiological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 207, 2012.

WANG, W. et al. Chitosan derivatives and their application in biomedicine. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 2, p. 487, 2020.

XIANG, H. et al. Phytochemical profiles and bioactivities of essential oils extracted from seven *Curcuma* herbs. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 298–305, 2018.

YEUL, V. S.; RAYALU, S. S. Unprecedented chitin and chitosan: A chemical overview. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, p. 606-614, 2013.

YOUNES, I. et al. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 57–63, 18 ago. 2014.

YUAN, G.; CHEN, X.; LI, D. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. **Food Research International**, v. 89, p. 117-128, 2016.

YUAN, Y. et al. Insight into physicochemical, rheological, and antibacterial properties of chitosan extracted from antarctic krill: A comparative study. **Molecules**, v. 25, n. 18, 2020.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. **Food Research International**, v. 89, p. 117-128, 2016.

ZHENG, H. et al. Assembly and analysis of the whole genome of *Arthroderma uncinatum* strain T10, compared with *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum*. **Mycoses**, v. 63, n. 7, p. 683–693, 2020.