

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

DANIELA BEZERRA MACEDO

**MEMBRANAS DE QUITOSANA ASSOCIADA A CÚRCUMA:
PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
BIOCOMPATIBILIDADE E EFEITOS ANTIMICROBIANOS**

**CHITOSAN MEMBRANES ASSOCIATED WITH TURMERIC:
PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF
BIOCOMPATIBILITY AND ANTIMICROBIAL EFFECTS**

São Paulo – SP

2024

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

DANIELA BEZERRA MACEDO

**MEMBRANAS DE QUITOSANA ASSOCIADA À CÚRCUMA:
PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
BIOCOMPATIBILIDADE E EFEITOS ANTIMICROBIANOS**

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). Lívia Assis
Orientador(a)

Prof. Dr(a). Adriana Pavinatto
Coorientador

São Paulo – SP
2024

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

M12m MACEDO, Daniela Bezerra.

Membranas de quitosana associada a cúrcuma: produção, caracterização e avaliação da biocompatibilidade e efeitos antimicrobianos / Daniela Bezerra Macedo -- São Paulo: Universidade Brasil, 2024.
53 f. il. color.

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

Orientação: Profa. Dra. Livia Assis.

Coorientação: Profa. Dra. Adriana Pavinatto.

1. Quitosana. 2. Cúrcuma. 3. Citotoxicidade. 4. Efeito antimicrobiano. 5. Reparo de feridas. I. Assis, Livia. II. Pavinatto, Adriana. III. Título.

CDD 620.82

TERMO DE APROVAÇÃO



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

TERMO DE APROVAÇÃO

DANIELA BEZERRA MACEDO

"MEMBRANAS DE QUITOSANA ASSOCIADA A CÚRCUMA: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA BIOCMPATIBILIDADE E EFEITOS ANTIMICROBIANOS."

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Membros da banca:

Orientador(a): Lívia Assis Garcia

Membro interno: Ana Laura Martins de Andrade

Membro interno: Priscila Pereira Fávero

Membro externo: Samuel Guerra Torres

Membro externo: Eliane Mendes Rodrigues

Orientador(a): Lívia Assis Garcia

Documento assinado digitalmente

gov.br

LÍVIA ASSIS GARCIA

Data: 04/12/2024 14:39:46-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Membro interno: Ana Laura Martins de Andrade

Documento assinado digitalmente

gov.br

ANA LAURA MARTINS DE ANDRADE

Data: 04/12/2024 15:15:52-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Membro interno: Priscila Pereira Fávero

Documento assinado digitalmente

gov.br

PRISCILA PEREIRA FAVERO

Data: 05/12/2024 10:43:57-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

www.ub.edu.br



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

Membro externo: Samuel Guerra Torres

Documento assinado digitalmente
gov.br SAMUEL GUERRA TORRES
Data: 04/12/2024 17:55:39-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Membro externo: Eliane Mendes Rodrigues

Documento assinado digitalmente
gov.br ELIANE MENDES RODRIGUES
Data: 04/12/2024 17:06:57-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Houve alteração do título da dissertação da defesa de tese?

- Sim
 Não

São Paulo, 04 de dezembro de 2024

Presidente da Banca: Livia Assis Garcia

www.ub.edu.br

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

Título do documento 1/10

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do 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(amos) 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.

INTITULADO: MEMBRANAS DE QUITOSANA ASSOCIADA A CÚRCUMA: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E EFEITOS ANTIMICROBIANOS

Houve alteração do título da dissertação da defesa de tese?

- Sim
 Não

Autores

Discente: Daniela Bezerra Macedo

Documento assinado digitalmente

gov.br

DANIELA BEZERRA MACEDO
Data: 06/12/2024 18:24:02-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Orientador(a): Livia Assis Garcia

Documento assinado digitalmente

gov.br

LIVIA ASSIS GARCIA
Data: 04/12/2024 14:39:46-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

www.ub.edu.br



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

Título do documento 2/10



Documento assinado digitalmente
ADRIANA PAVINATTO DA COSTA
Data: 04/12/2024 14:47:21-0300
Verifique em <https://validar.itb.gov.br>

assinatura do membro

São Paulo, 04 de dezembro de 2024.

www.ub.edu.br

“Dedico esse trabalho aos meus pais, Hildebrando e Marilene, a minha filha Lohane e aos meus irmãos, Juliana e Glauber, por me acompanharem nessa trajetória, sempre me incentivando a adquirir novos conhecimentos e alcançar meus objetivos.”

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar fé para seguir e vencer os obstáculos para que eu pudesse chegar ao meu objetivo.

Aos meus pais, Hildebrando Macedo Filho e Marilene de Sousa Bezerra Macedo, por sempre segurarem na minha mão nos momentos em que mais precisei.

À minha filha, Lohane Bezerra Macedo Leal Barros, por existir na minha vida e tornar os meus dias mais alegres, sempre me encorajando a estudar mesmo a saudade persistindo com a nossa distância.

Aos meus irmãos, Juliana Bezerra Macedo e Glauber Bezerra Macedo, por estarem comigo nessa caminhada sempre unidos e firmes.

Aos meus tios, Renata e Cesar, por todo o apoio durante esta trajetória.

À minha orientadora, Lívia Assis Garcia, pelos ensinamentos a mim repassados e pela paciência durante essa trajetória para que eu pudesse adquirir novos conhecimentos que levarei para a vida.

À CAPES, por me permitir ser bolsista e ingressar no mundo científico.

À Cintia Martignago, pela ajuda nos experimentos realizados na Unifesp.

À Claudia, coordenadora do laboratório da Unifesp Baixada Santista.

"Se avexe não amanhã pode acontecer tudo inclusive nada, se avexe não a lagarta rasteja até o dia em que cria asas, se avexe não que a burrinha da felicidade nunca se atrasa, se avexe não amanhã ela para na porta da tua casa, se avexe não toda caminhada começa com o primeiro passo, a natureza não tem pressa segue seu compasso, inexoravelmente chega lá..."

FLÁVIO JOSÉ

RESUMO

Feridas cutâneas causam dor, comprometimento funcional e diminuem a qualidade de vida, causando um impacto econômico significativo. A quitosana e a cúrcuma possuem propriedades com potenciais de favorecer o reparo de feridas cutâneas. No entanto, a relação entre a quitosana associada a cúrcuma, assim como as propriedades físico-química e os efeitos biológicos, ainda não foram elucidados. Assim, o objetivo do presente estudo foi produzir, caracterizar e avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de membrana a base de quitosana associada a cúrcuma produzidas através da técnica de *casting*, em linhagem de fibroblastos (L929), bem como, o potencial antimicrobiano para *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*). Foram produzidas três membranas a base de quitosana de média massa molar através da técnica de formação de filmes finos *casting* (evaporação do solvente): membrana a base de quitosana 1% (m/v; QM); quitosana associado ao glicerol 30% (m/m em relação à massa da quitosana; QMG); quitosana associado ao glicerol 30% e a cúrcuma 1,5% (m/m em relação à massa da quitosana; QMGC). Para a caracterização das propriedades físico-químicas e morfológicas das membranas foram utilizadas as técnicas de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), ângulo de contato e medidas de espessura. Para a avaliação da viabilidade/citotoxicidade celular foi utilizado células L929 na concentração de 1×10^4 por meio de ensaio de *AlamarBlue*® e *Picrogreen*. Quanto a avaliação do potencial antimicrobiano foi utilizado Cepas de bactérias Gram-positivas *S. aureus* e de bactérias Gram-negativas *E. coli* na concentração de 1×10^8 por meio da avaliação do halo de inibição. Os resultados mostram que todas as membranas apresentaram ser autossustentáveis, homogêneas e flexíveis, sendo as membranas QMG e QMGC as mais flexíveis e mais hidrofílicas em comparação a membrana QM. Foi observado bandas vibracionais para grupos químicos de quitosana em todas as membranas e de glicerol em QMG e QHGC. Com relação à avaliação de citotoxicidade, todas as membranas apresentam aumento da atividade metabólica/viabilidade, assim como uma maior proliferação de células de fibroblastos no período experimental de 72 horas quando comparado ao de 24 horas de cultivo. Ainda, todas as membranas apresentaram halo de inibição aos microrganismos testados, sendo que a membrana QMGC promoveu o maior halo de inibição. Com os resultados obtidos no presente estudo, é possível confirmar o potencial reparador das membranas a base de quitosana produzidas através da técnica de *casting*, assim como seu potencial antimicrobiano, com destaque para a membrana associada a cúrcuma. Entretanto, faz-se necessário estudos que elucidem o uso das membranas como potenciais biomateriais para uso como curativos bioativos de feridas cutâneas.

Palavras-chave: Quitosana. Cúrcuma. Citotoxicidade. Efeito antimicrobiano. Curativo. Reparo de feridas.

ABSTRACT

Skin wounds cause pain, functional impairment and quality of life and are associated with significant economic impact. Chitosan and turmeric have properties that have the potential to promote the repair of skin wounds. However, the relationship between medium molar mass chitosan associated or not with turmeric, as well as the physicochemical properties and biological effects have not yet been elucidated. Thus, the objective of the present study was to produce, characterize and evaluate, in vitro, the cytotoxicity of a membrane based on medium molar mass chitosan associated or not with turmeric in a fibroblast line (L929), as well as the antimicrobial potential for *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*). Three chitosan-based membranes of medium molar mass were produced using the casting (solvent evaporation) thin film formation technique: 1% chitosan-based membrane (m/v; QM); chitosan associated with 30% glycerol (m/m in relation to the mass of chitosan; QMG); chitosan associated with 30% glycerol and 1.5% turmeric (m/m in relation to the mass of chitosan; QMGC). To characterize the physicochemical and morphological properties of the membranes, infrared absorption spectroscopy (FTIR), contact angle and thickness measurements were used. To evaluate cell viability/cytotoxicity, L929 cells were used at a concentration of 1×10^4 using the alamarBlue® and Picrogreen assay; To evaluate the antimicrobial potential, strains of Gram-positive bacteria *S. aureus* and Gram-negative bacteria *E. coli* were used at a concentration of 1×10^8 by evaluating the inhibition halo. The results show that all membranes were sustainable, homogeneous and flexible, with the QMG and QMGC membranes being the most flexible and most hydrophilic compared to the QM membrane. Vibrational bands were observed for chemical groups of chitosan and glycerol in all membranes. Regarding the evaluation of cytotoxicity, all membranes showed higher values of metabolic activity/viability, as well as a greater proliferation of fibroblast cells in the experimental period of 72 hours when compared to 24 hours of culture. Furthermore, all membranes presented an inhibition halo to the tested microorganisms, with the QMGC membrane promoting the greatest inhibition halo. With the results obtained in the present study, it is possible to confirm the reparative potential of chitosan-based membranes of medium molar mass, as well as their antimicrobial potential, with emphasis on the membrane associated with turmeric. However, further studies are needed to elucidate the use of these membranes as potential biomaterials for bioactive wound dressings.

Keywords: Chitosan. Turmeric. Cytotoxicity. Antimicrobial effect. Biological dressing. Wound repair.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fotomicrografias representativas das membranas formadas	35
Figura 2- Fotomicrografias representativas da força de tração	36
Figura 3- Espectros de FTIR para membranas formadas	37
Figura 4- Gráfico de redução de alamarBlue® de células L929 no período de 24 e 72 horas.....	39
Figura 5- Gráfico representativo dos valores da proliferação celular de L929 no período de 24 e 72 horas.....	40
Figura 6- Fotomicrografias representativas e gráfico da zona de inibição de <i>S. aureus</i>	41
Figura 7- Fotomicrografias representativas e gráfico da zona de inibição de <i>E. coli</i>	42

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
GA	Grau de acetilação
GLI	Glicerol
GPC	Cromatografia de exclusão por tamanho
\overline{MM}	Massa molar média
QM	Membrana de quitosana média
QMG	Membrana de quitosana glicerol
QMGC	Membrana de quitosana glicerol e cúrcuma
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>T. rubrum</i>	<i>Trychophyton rubrum</i>
UV	Luz ultravioleta
-NH ₂	Grupo amino
OH	Hidroxila
EGF	Fator de crescimento epidérmico
TGF- β	Fator de crescimento transformador do tipo beta
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
IL	Interleucina
ROS	Espécie reativa de oxigênio
Cm	Centímetro
H	Hora
Mw	Medida de Potência
TNF	Fator de necrose tumoral
Nm	Nanômetro
μ l	Microlitro

MI	Mililitro
%	Porcentagem
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
Min	Minuto
PH	Potencial Hidrogeniônico
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 PELE E FERIDAS CUTÂNEAS.....	21
3.2 QUITOSANA	24
3.3 CÚRCUMA E CURCUMINA.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 MATÉRIA-PRIMA.....	30
4.2 PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS	30
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MEMBRANAS	30
4.3.1 Medidas de espessura.....	31
4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	31
4.3.3 Ângulo de contato	31
4.4 AVALIAÇÕES IN VITRO	31
4.4.1 Linhagens celulares e condições de cultura.....	31
4.4.2 Cepas e preparação do inóculo.....	33
4.4.3 Avaliação da zona de inibição	33
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5 RESULTADOS	35
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MEMBRANAS	35
5.1.1 Formações das membranas.....	35
5.1.2 Medidas de espessura.....	36
5.1.3 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	36
5.1.4 Ângulos de contato	38
5.2 AVALIAÇÕES IN VITRO	38
5.2.1 Atividade metabólica/viabilidade.....	38
5.2.2 Proliferação celular.....	39
5.2.3 Zona de inibição.....	40
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Feridas cutâneas decorrentes de cirurgias, queimaduras, escoriações e outros traumas, são condições comumente encontradas na prática clínica e, na maioria das vezes, estão associadas a dor, a incapacidade funcional e, até mesmo, com a morte (REZAIE; MOMENI-MOGHADDAM; NADERI-MESHKIN, 2019).

O reparo de uma ferida da pele circunscreve processos que contemplam diversos fenômenos bioquímicos, celulares e fisiológicos com a função de restaurar a integridade do tecido epitelial e tecido conjuntivo lesado (GURTNER et al., 2008). Os processos sequenciais de inflamação, proliferação e maturação/remodelamento são essenciais para que o reparo ocorra de maneira satisfatório (RIPPA; KALABUSHEVA; VOROTELYAK, 2019; RODRIGUES et al., 2019). No entanto, algumas condições específicas como a diabetes, neuropatia, obesidades, isquemia, comorbidades e presença de microrganismo, com destaque para as bactérias Gram-negativas, como a *Escherichia coli* (*E. coli*) e Gram-positiva como a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), podem prejudicar a ordem desses eventos sequenciais de reparo, resultando em uma ferida cutânea crônica (BOWER et al., 2020; LEONG et al., 2018; RIPPA; KALABUSHEVA; VOROTELYAK, 2019).

Nos últimos anos, observa-se um aumento expressivo no número de casos de feridas cutâneas crônicas, o que impacta em altos custos para a saúde pública devido ao tratamento prolongado e, muitas vezes, pouco eficientes (SEM et al., 2019). É estimado que, devido ao envelhecimento populacional e crescimento exponencial de indivíduos portadores de distúrbios metabólicos, a incidência de feridas crônicas aumente cada vez mais (SEN et al., 2021).

Dentro deste contexto, os principais objetivos terapêuticos preconizados no tratamento de feridas cutâneas crônicas estão voltados ao alívio da sintomatologia dolorosa, inativar os microrganismos existentes e utilizar estratégias que favoreçam o reparo da ferida (SEN et al., 2019). Nesta circunstância, diversos tratamentos vêm sendo testados e utilizados, entretanto, nenhum tratamento específico foi estabelecido (GOODARZI et al., 2018).

O uso de curativos funcionais a base de quitosana tem recebido considerável atenção na área da regeneração de tecidos por se tratar de um procedimento de baixo custo, versatilidade, ampla disponibilidade e recursos abundantes (UL-ISLAM et al., 2023; WANG et al., 2020). A quitosana, também conhecida como (1→4)-2-amino-2-

desoxi- β -D-glucana, é um biomaterial polimérico obtido pela desacetilação da quitina extraída das cascas dos crustáceos. De acordo com FENG et al. (2021), muitos benefícios da quitosana e seus derivados vem sendo relatados no tratamento de feridas cutâneas, incluindo: ações farmacológicas desejáveis como hemostáticas (WANG et al., 2019), modulação da inflamação (RIBEIRO et al., 2021), promoção da formação do tecido de granulação (WANG et al., 2020; GOODARZI et al., 2020) e antibacteriana (KASSEM; AYOUB; MALAEB, 2019; MOHANTY; DAS; SAHOO, 2012); excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade (LI et al., 2019); propriedades de absorção e retenção de água favoráveis; e a presença de grupos amino (-NH₂) e hidroxila (-OH) nas cadeias moleculares, que permitem a inclusão de outros grupos e componentes químicos para potencializar certas funções biológicas (ABD EL-HACK et al., 2020).

Ademais, desde a antiguidade, substâncias naturais de origem vegetais têm sido utilizadas como agentes fitoterápicos para auxiliar o reparo de feridas e, mais recentemente, estudos estão surgindo na tentativa de demonstrar seu efeito benéfico no tratamento de feridas cutâneas. A cúrcuma, *Cúrcuma longa* L. (nome comum: açafrão), tem sido considerada potencial candidata terapêutica devido às suas propriedades biofuncionais, especialmente atividades em reduzir mediadores pró-inflamatórios, antioxidantes, analgésica, reparadora e antimicrobianas que desempenham um papel crucial na gestão e restauração de feridas (ABDULRAHMAN et al., 2020; ADAMCZAK; OŻAROWSKI; KARPIŃSKI, 2020; JOE; VIJAYKUMAR; LOKESH, 2004).

Desta forma, embora haja na literatura evidências sobre o uso de curativos biológicos a base de quitosana, algumas questões referentes à sua utilização no reparo de feridas crônicas ainda não são bem compreendidas. Em particular, há uma carência de estudos na literatura investigando o efeito de membranas produzidas pela técnica de *casting* a base de quitosana associada com a cúrcuma em células dérmicas, assim como sobre os microrganismos prevalentes em feridas cutânea e que levam ao insucesso do reparo das mesmas. Diante disto, foi levantada a hipótese de que a produção de membranas através da técnica de *casting* a base de quitosana associada de cúrcuma poderia ter um potencial antimicrobiano sem ocasionar citotoxicidade em células responsáveis pelo reparo da pele, constituindo-se um biomaterial adequado e promissor a ser utilizado na prática clínica. Nesse sentido, evidências celulares e microbiológicas perante esse cenário são de grande valia para

compreender com exatidão os benefícios da abordagem terapêutica no tratamento de feridas cutâneas crônicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir, caracterizar e avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de membrana a base de quitosana associada a cúrcuma produzidas através da técnica de *casting*, em linhagem de fibroblastos (L929), assim como o potencial antimicrobiano para *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir membranas a base de quitosana associadas ou não a cúrcuma através da técnica *casting* (evaporação do solvente);
- Caracterizar as propriedades físico-químicas das membranas através de medidas de espessura, medidas de espectroscopia na região do infravermelho e ângulo de contato;
- Investigar os efeitos da membrana de quitosana associado a cúrcuma na citotoxicidade fibroblastos (L929);
- Verificar a efetividade da membrana de quitosana associado a cúrcuma sobre os microrganismos prevalentes em lesões cutâneas crônicas;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PELE E FERIDAS CUTÂNEAS

A pele, sendo o maior órgão não visceral do corpo, desempenha uma série de funções, incluindo proteção, termorregulação, sensibilidade e síntese e absorção de vitaminas, além da função sensorial e estética (WONG et al., 2016). É composta, morfológicamente, por duas camadas: epiderme, e derme. A epiderme é a camada mais superficial, consiste em um tecido avascular, tendo como célula principal os queratinócitos intimamente interligados em estratos denominados de córneo (camada mais externa), lúcido, granular, espinhoso e basal (camada mais profunda) (ARDA; GÖKSÜGÜR; TÜZÜN et al., 2014). Outros tipos celulares também fazem parte da epiderme, como os melanócitos, com formato dendrítico, responsáveis por produzir a melanina (pigmento que define a coloração da pele e absorve a radiação UV); células de *Merkel* cuja função é atuarem como receptores de percepção tátil e mecânica; células de *Langerhans* com a finalidade promover a defesa imunológica da pele (BARONI et al., 2012).

A derme é uma estrutura mais espessa e complexa que abriga nervos sensoriais, mecanorreceptores, vasos sanguíneos, glândulas sudoríparas e sebáceas, folículos capilares, bem como uma abundante matriz extracelular composta por estruturas fibrilares (colágeno e elastina) e não fibrilares (ácido hialurônico, glicoproteínas e proteoglicano). Todos os componentes da matriz extracelular são sintetizados por fibroblastos, principal constituinte celular da derme, embora é possível encontrar uma variedade de células imunológicas, como os macrófagos e células dendríticas (ARDA; GÖKSÜGÜR; TÜZÜN, 2014; WONG et al., 2016).

Agentes estressores de diversas etiologias podem comprometer a integridade da pele, dando origem às feridas cutâneas (REZAIE; MOMENI-MOGHADDAM; NADERI-MESHKIN, 2019). Se a intensidade da agressão for leve, acometendo apenas estruturas superficiais, epiderme e uma extensão da derme, a ferida é chamada de superficial e, as de maior intensidade que comprometem toda a derme, tela subcutânea, músculos, tendões e outras estruturas recebem o nome de feridas graves ou profundas (GURTNER et al., 2008). As feridas superficiais reparam-se frequentemente por regeneração, ou seja, restauração das características estruturais e funcionais do tecido, e nas feridas profundas ocorre a cicatrização, onde há uma

deposição de um tecido cicatricial caracterizado como tecido conjuntivo não modelado, formando a cicatriz e alterando a estrutura e funcionalidade do tecido lesado (PANG et al., 2017).

Para que ocorra o reparo de uma ferida cutânea é necessária ocorrer processos sobrepostos em tempo e espaço, sendo eles: inflamação, proliferação e remodelamento (GURTNER et al., 2008). A fase inicial, inflamatória, é caracterizada pela ativação do sistema de coagulação após a uma imediata vasoconstricção e agregação plaquetária. O fibrinogênio é transformado em fibrina insolúvel que forma coágulos, garantindo a hemostasia local. Em seguida, devido à liberação de histamina pelos mastócitos, ocasiona uma vasodilatação e o recrutamento de células inflamatórias, tais como neutrófilos e macrófagos para o local da lesão, tendo como função fagocitar patógenos e células mortas e, também liberam citocinas e fatores de crescimento que auxiliam os eventos moleculares e celulares do reparo (GURTNER et al., 2008; RIPPA; KALABUSHEVA; VOROTELYAK, 2019).

Por volta de 48 a 72 horas após a lesão, sobrepondo-se a essa etapa, se inicia a fase proliferativa com o recrutamento adicional de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, responsáveis por liberar fatores de crescimento específicos e essenciais para a formação do tecido de granulação preenchendo a lacuna tecidual, ou seja, há uma deposição de colágeno e outros componentes da matriz extracelular e a formação de novos vasos sanguíneos. Entre os principais fatores de crescimento liberados por estas células, destaca-se o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento transformador do tipo beta (TGF- β), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (REZAI; MOMENI-MOGHADDAM; NADERI-MESHKIN, 2019). A última fase do reparo, o remodelamento, também conhecido como fase de maturação da ferida, é caracterizada pela reorganização das fibras de colágeno com consequente aumento da força tênsil da pele (RODRIGUES et al., 2019).

Desta forma, a tendência é que a ferida aguda se repare de maneira espontânea e efetiva, restabelecendo as propriedades anatômicas e funcionais da pele. Contudo, em determinadas conjunções específicas, como em lesões extensas na pele ou doenças associadas, como a diabetes ou infecções, prejudicam o reparo, resultando em feridas cutâneas crônicas (BOWER et al., 2020; RIPPA; KALABUSHEVA; VOROTELYAK, 2019).

Cabe enfatizar o impacto negativo de microrganismos oportunistas que impactam significativamente no retardo do reparo da ferida (ORTINES et al., 2018). Apesar das feridas cutâneas serem frequentemente caracterizadas como polimicrobianas, sabe-se que as bactérias Gram-positivas como as *S. aureus* e Gram-negativas como as *E. coli* são os patógenos mais dominantes e possuem importância epidemiológica primordial em feridas cutâneas crônicas (LEONG et al., 2018).

Assim, devido à baixa taxa de cura completa e o aumento da prevalência de feridas cutâneas crônicas, principalmente devido o envelhecimento populacional e ao aumento exponencial de portadores de comorbidades, a problemática gera um impacto significativo na saúde e na qualidade de vida dos acometidos, visto que as lesões estão frequentemente associadas a dor, perda de função e mobilidade, depressão, angústia e ansiedade, constrangimento, isolamento social, morbidades crônicas ou mesmo morte (SEN et al., 2019, 2021).

Vários tipos de tratamento para feridas crônicas vêm sendo desenvolvidos e estudados, todavia, a gestão do tratamento ainda é controversa (GOODARZI et al., 2020). O tratamento padrão das feridas crônicas incluem o manejo da doença subjacente, tratamentos locais para melhorar o ambiente da ferida, como desbridamento, curativo e tratamento sistemático (por exemplo, aplicação de antibióticos, suplementos nutricionais, recursos eletrofísicos) e muitos outros. No entanto, muitas vezes os métodos conservadores resultam em altas taxas de recorrências e, até mesmo amputações (SEN et al., 2021).

O interesse na aplicação de biomateriais, no campo da engenharia de tecidos e regeneração tecidual aumentou consideravelmente nos últimos anos. Os materiais considerados ideais para a produção de curativos biológicos a serem utilizados no tratamento de feridas cutâneas devem ser flexíveis, estáveis, biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos, ecológico e amplamente aplicáveis com a capacidade manter as feridas úmidas e adsorver o exsudado (FENG et al., 2021). Dentro deste contexto, a quitosana e a cúrcuma vem sendo consideradas candidatas promissoras para serem utilizados na fabricação de curativos funcionais no tratamento de ferida cutâneas principalmente por ser uma opção de tratamento conservador e de baixo custo (GUEST et al., 2021; WANG et al., 2020).

3.2 QUITOSANA

A principal forma de obtenção da quitosana, um aminopolissacarídeo (poli-1,4-D-glucosamina), é através do processo de desacetilação da quitina, o polímero mais abundante, depois da celulose, que tem recebido imensa consideração como um excelente biomaterial devido ao seu baixo custo, versatilidade, ampla disponibilidade, recursos abundantes e propriedades únicas (FAN et al., 2023; WANG et al., 2020).

A quitina é encontrada nas cascas de crustáceos (camarões, caranguejos, chocos, cascas de ovos, caracóis), insetos e paredes celulares de certas bactérias e fungos e é extraída através de vários métodos, como extração química, hidrólise enzimática, extração microbiana e abordagens assistidas por micro-ondas (UL-ISLAM et al., 2023; WANG et al., 2020).

A conversão de quitina em quitosana é um processo de várias etapas (PAKIZEH; MORADI; GHASSEMI, 2021). A quitosana obtida consiste em unidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina que estão ligadas através de ligações β -1,4-glicosídicas (SHI et al., 2016). É pouco solúvel em soluções aquosas e alcalinas e possui uma ampla faixa de massa molar (M_w , 10 e 1000 kDa), grau de solubilidade e grau de desacetilação (50 e 95%), dependendo de sua fonte e métodos de extração (UL-ISLAM et al., 2023).

Esse polissacarídeo apresenta propriedades importantes para aplicações biológicas, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, adesividade e facilidade de modificação química (RIBEIRO et al., 2021; YOUNES; RINAUDO, 2015).

A quitosana tem sido amplamente estudada como curativos para feridas, visto que desempenha importante função em todos os estágios de reparo de uma ferida cutânea (FENG et al., 2021; RIBEIRO et al., 2021). A literatura atual mostra que, nos estágios iniciais no reparo, a quitosana é capaz de auxiliar no processo de hemostasia, visto que promove a adesão e agregação plaquetária, induzindo a agregação eritrocitária e inibindo a fibrinólise (FENG et al., 2021). De acordo com LORD et al. (2021), a quitosana é capaz de aumentar a expressão de uma glicoproteína (GPIIb-IIIa) nas membranas plaquetárias, promovendo assim a adesão das plaquetas à parede vascular e a agregação de plaquetas. Além disso, é relatado que a carga positiva da quitosana pode promover a agregação plaquetária ao interagir com a enorme quantidade de substâncias carregadas negativamente na superfície das plaquetas ativadas (WANG et al., 2019).

Ainda na fase inflamatória, os prótons liberados em locais inflamatórios podem contribuir para a protonação amino da quitosana, resultando em um efeito analgésico (BALAGANGADHARAN; DHIVYA; SELVAMURUGAN, 2017; RIBEIRO et al., 2021). Além disso, a quitosana mostra diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e pode equilibrar sinais pró-inflamatórios e anti-inflamatórios associados aos biomateriais de implantes, bem como melhorar a função de diferentes tipos de células, como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos (HOWLING et al., 2001; MORI et al., 1997; RIBEIRO et al., 2021).

Um importante efeito da quitosana no reparo de feridas na pele, é que ela é capaz de estimular a formação do tecido de granulação e angiogênese (FENG et al., 2021). Foi relatado que a quitosana induz macrófagos e fibroblastos a promover a secreção de citocinas e fatores de crescimento por macrófagos, como destaque para o TGF- β e PDGF. O TGF- β induz a migração de macrófagos para áreas feridas, promovendo a proliferação de fibroblastos e aumentando a secreção de colágeno. Já, o PDGF pode aumentar a angiogênese e estimular a migração e proliferação de fibroblastos, além de promover a síntese de glicosaminoglicanos, proteoglicanos e colágeno, todos benéficos para a formação de tecido de granulação (HOWLING et al., 2001; WANG et al., 2020).

Ademais, a quitosana é amplamente utilizada no tratamento de feridas devido às suas propriedades antibacterianas, entretanto seus mecanismos ainda não são claros (LI et al., 2019; VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017) . A parede celular das bactérias Gram-negativas é composta por uma membrana externa e uma camada de peptidoglicano. A camada interna é composta exclusivamente por fosfolipídios, enquanto a camada externa é composta por fosfolipídios e lipopolissacarídeos. A superfície das bactérias Gram-negativas é carregada negativamente devido aos grupos fosfato e pirofosfato dos lipopolissacarídeos na camada externa. A parede celular das bactérias Gram-positivas é composta por peptidoglicanos e ácidos teicóicos. A superfície das bactérias Gram-positivas é carregada negativamente devido aos grupos carboxila e fosfato dos ácidos teicóicos (FENG et al., 2021).

De acordo com BERNKOP-SCHNÜRCH et al., 2018, quando a quitosana de alta massa molar é dissolvida em soluções aquosas ácidas, os grupos NH₂ são protonados em cátions -NH₃⁺. As interações eletrostáticas entre -NH₃⁺ e lipopolissacarídeos na membrana celular de bactérias Gram-negativas, ou ácidos teicóicos em bactérias Gram-positivas, levam à distribuição desigual de cargas

negativas nas bactérias, resultando em uma dissolução da sua parede celular. A membrana celular bacteriana é deformada e rompida sob pressão osmótica insustentável, levando ao vazamento do conteúdo celular, ou seja, a lise celular (KASSEM; AYOUB; MALAEB, 2019; LI et al., 2019; XING et al., 2009). O estudo de XING et al. (2009), revelaram que as moléculas de quitosana aderiram à superfície de *S. aureus* e *E. coli* após 30 min de contato, e foram observadas rupturas da parede celular e vazamento de conteúdo celular para ambas as cepas bacterianas.

A quitosana com baixo massa molar (não superior a 5.000 D) pode penetrar na parede celular bacteriana para formar complexos com DNA, prejudicando a função da DNA polimerase e RNA polimerase e, assim, suprimindo a replicação e transcrição de DNA e RNA, que inibe a proliferação bacteriana (FARHADIHOSSEINABADI et al., 2019).

Adicionalmente, a literatura também sugere a incorporação de outros ativos em curativos a base de quitosana para acentuar o seu potencial regenerativo e antimicrobiano (TOLAIMATE et al., 2020).

3.3 CÚRCUMA E CURCUMINA

O potencial terapêutico da cúrcuma (*Cúrcuma longa L.*), também conhecida como açafrão-da-terra e açafrão indiano, que pertence à família *Zingiberaceae*, vêm sendo reportado há mais de 4000 anos na medicina tradicional, quando a aplicação tópica de suco ou pasta de açafrão era utilizado no tratamento de feridas cutâneas (GUEST et al., 2021).

De acordo com GUEST et al. (2021), acredita-se que a cúrcuma tenha origem na Índia, sendo esta o maior produtor e consumidor desta especiaria no mundo. Quase 80% do açafrão do mundo é produzido na Índia, com os 20% restantes produzidos na China, Mianmar, Bangladesh, Nigéria e outros. Possui uma importância econômica significativa, devido às suas diversas utilizações e é exportado para todo o mundo. A planta é cultivada e propagada através do seu pedúnculo radicular em climas quentes e úmidos em altitudes baixas a médias (até 1200 m), onde é colhida escavando os rizomas quando as folhas começam a amarelar (aproximadamente 8 meses após o plantio).

Há dois séculos passados, Vogel e Pelletier isolaram o componente mais ativo dos rizomas da cúrcuma (2 a 5%), uma “matéria de cor amarelo-alaranjado” e a

chamaram de curcumina, substância que vem sendo estudada devido às suas propriedades biofuncionais potencialmente relevantes para a regeneração de tecidos (AKABERI et al., 2021). A curcumina foi quimicamente representada como 1,6-heptadieno-3,5-diona-1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-(1E, 6E) em 1960 por Milobedzka e Lampe (GUEST et al., 2021).

A curcumina é insolúvel em água em valores de pH ácidos e naturais, e é solúvel em etanol, álcalis, ácido acético, cetona e clorofórmio e ligeiramente solúvel em solventes orgânicos alifáticos ou alicíclicos, como ciclohexano e hexano. Sofre rápida degradação em valores de pH alcalino e se funde a temperaturas de 176-177°C, formando sais marrom-avermelhados com álcalis. Esta molécula fenólica possui uma cadeia principal alifática insaturada com anel aromático que está conectada a grupos OH por uma α , β -insaturada- β -dicetona (ARAÚJO; LEON, 2001; KAMINAGA et al., 2003).

Diversos grupos de pesquisa têm estudado os efeitos da curcumina em diferentes tecidos biológico com a finalidade de melhor compreender os mecanismos de ação que sustentam sua utilização local e tópica (ADAMCZAK; OŻAROWSKI; KARPIŃSKI, 2020; VAUGHN et al., 2017). Atualmente, esse polifenol tem sido descrito como capaz de modular condições inflamatórias (PARADA et al., 2015), possui ações antioxidantes (FAN et al., 2015; LUNDEVIG et al., 2015), imunomodulatórias e angiogênicas (MEHRABANI et al., 2015), assim como propriedades antimicrobianas (inativação de bactérias e fungos), sustentando suas heterogêneas aplicações clínicas.

A literatura relata que a curcumina possui potencial terapêutico em diversas doenças de pele, incluindo lesões cutâneas infecciosas ou não, doenças alérgicas, queimaduras e outras condições que culminam no reparo da pele (KUMAR et al., 2023; NGUYEN et al., 2013; VAUGHN; BRANUM; SIVAMANI, 2016). A capacidade da curcumina de inibir a amplificação da inflamação e a cronificação do processo tem sido demonstrada em muitas condições patológicas da pele, como psoríase, dermatite atópica, acne e alopecia (AKBIK et al., 2014; KUMAR et al., 2023; VAUGHN et al., 2017). FAN et al. (2015), defendem que terapia pode suprimir a atividade do NF- κ B, atenuando as respostas inflamatórias. Estudos anteriores mostraram que a curcumina pode reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β (JOE; VIJAYKUMAR; LOKESH, 2004). Ao reduzir a inflamação, a curcumina favorecer o recrutamento de células epiteliais e fibroblastos, assim como a produção de matriz

extracelular, contribuindo para a melhora do reparo tecidual (GOPINATH et al., 2004; MOHANTY; DAS; SAHOO, 2012).

A curcumina também demonstra impacto benéfico na estimulação de novos vasos sanguíneos em feridas cutâneas (AKBIK et al., 2014; JIA et al., 2014; MEHRABANI et al., 2015), características essenciais para o reparo bem-sucedido de feridas.

Ainda, a ação antimicrobiana da curcumina tem sido referenciada desde sua primeira documentação científica em 1949 (ADAMCZAK; OŻAROWSKI; KARPIŃSKI, 2020; SCHRAUFSTATTER e BERNT, 1949). O estudo conduzido em 1974 realizado por Lutomski e colaboradores (1974), mostraram que a curcumina possui eficácia antimicrobiana contra 85 cepas clínicas bacterianas e fúngicas, sendo uma alta eficácia contra cocos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus tetragenus*, *M. luteus*), bacilos formadores de esporos (espécies *Bacillus* e *Clostridium*), algumas bactérias Gram-negativas (*Acinetobacter lwoffii*, *Alcaligenes faecalis*) e fungos (por exemplo, *Candida stellatoidea*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium gypseum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Scopulariopsis brevicaulis*).

A justificativa de sua utilização é devido ao fato a molécula vegetal possui ação fotodinâmica capaz de gerar altas taxas de espécie reativas de oxigênio (ROS), atuando como um forte oxidante para matar diretamente micro-organismos (ABDULRAHMAN et al., 2020). Ainda, é relatado que a curcumina é capaz ocasionar a inibição da atividade metabólica, mudanças na cápsula e destruição do material genético do micro-organismo, sugerindo uma grande promessa terapêutica em uma variedade de infecções de pele e mucosas (VAUGHN et al., 2017).

Diversos grupos de pesquisas confirmaram os resultados positivos da cúrcuma no tratamento de feridas cutâneas (GOPINATH et al., 2004; JIA et al., 2014; MEHRABANI et al., 2015; MOHANTY; DAS; SAHOO, 2012). Um recente ensaio clínico controlado e randomizado realizada por MOKHTARI; RAZZAGHI; MOMEN-HERAVI et al. (2021) destacou os efeitos positivos em termos de redução do tamanho da ferida em pacientes diabéticos sem eventos adversos relacionado ao tratamento. Entretanto, a ausência de estudos sobre sinergismos entre a cúrcuma e os outros bioativos ainda é incerta, e recomenda-se que estudos adicionais de alta qualidade sejam realizados com objetivo de confirmar a eficácia e segurança dos compostos para o tratamento de feridas crônicas (TEJADA et al., 2016).

De acordo com os relatos supracitados, sugere-se que a quitosana e a cúrcuma possuam potencial terapêutico promissor em reduzir complicações encontradas durante o processo de reparo de feridas cutâneas. No entanto, é possível verificar que há uma carência de estudos na literatura investigando o efeito de membranas produzidas pela técnica de castings a base de quitosana associada a cúrcuma no reparo da pele. Portanto, neste trabalho, abordamos algumas dessas questões ainda não resolvidas. Em primeiro lugar, produzir, caracterizar e avaliar a influência de membranas a base de quitosana associada a cúrcuma na viabilidade de células dérmicas (fibroblastos). Em segundo lugar, verificar se as membranas poderiam inativar micro-organismos mais prevalentes e responsáveis por ocasionar o insucesso no reparo tecidual.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

A amostra da quitosana de massa molar média foi obtida comercialmente *Sigma-Aldrich* (São Paulo – SP, Brasil) e utilizada conforme recebida. O glicerol (Gli) e o ácido acético foram obtidos da *LabSynth* (São Paulo – SP, Brasil) e utilizados conforme recebidos. A amostra de cúrcuma longa foi obtida comercialmente da Farmácia Malheiros (São Paulo – SP Brasil) 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. Foi utilizada a técnica de formação de filmes finos *casting* (evaporação do solvente) e foram produzidas três membranas a partir de uma solução de quitosana de média massa molar:

- 1) Membrana de Quitosana Média (QM): quitosana de média massa molar a 1% p/p dissolvida em solução aquosa de ácido acético 10% (v/v);
- 2) Membrana de Quitosana Glicerol (QMG): quitosana de média massa molar a 1% p/p dissolvida em solução aquosa de ácido acético 10% associado ao glicerol 30% (p/p em relação à massa da quitosana);
- 3) Membrana de Quitosana Glicerol e Cúrcuma (QMGC): quitosana de média massa molar a 1% p/p dissolvida em solução aquosa de ácido acético 10% associado ao glicerol 30% e a cúrcuma longa solubilizada 1,5% (p/p em relação à massa da quitosana).

Para a produção das membranas foi utilizado um volume de 10 mL de solução, pipetadas em placas de silicone. O tempo de secagem ao ar em fluxo contínuo e temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) das membranas foi de 48 a 72 h.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

4.3.1 Medidas de espessura e tração

As membranas foram colocadas no micrômetro da marca Mitutoyo *M4 Checker (Brasil)* e as medidas de espessura foram feitas em triplicata. O teste de tração foi realizado de maneira manual, onde o examinador exerceu uma força de tração segurando as extremidades das membranas.

4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

As estruturas químicas dos componentes das membranas foram identificadas por espectroscopia FTIR. As análises foram realizadas em equipamento da marca *Thermo Nicolet Nexus 470* com transformada de Fourier usando o modo de reflectância atenuada (ATR). Utilizou-se as faixas de 4000-500 cm^{-1} para coletar os espectros e foi realizado um total de 64 varreduras e resolução de 2 cm^{-1}

4.3.3 Ângulo de contato

Foi utilizado um goniômetro (*KSV instruments* modelo CAM 200) para analisar a molhabilidade das membranas. Com o objetivo de identificar os ângulos de contato, uma gota (50 μl) de água foi adicionada sobre a superfície da membrana acopladas em uma placa e posicionadas centralmente a seringa. Em seguida, foram capturadas imagens e os ângulos de contato foram 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*.

4.4 AVALIAÇÕES *IN VITRO*

4.4.1 Linhagens celulares e condições de cultura

O experimento foi conduzido utilizando 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, sendo elas 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. O meio de cultura foi removido a cada 2-3 dias e as células foram 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.

4.4.1.1 ATIVIDADE METABÓLICA

Para a realização das análises da atividade metabólica, 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. Após 24 h, o meio de cultura foi substituído e adicionado as membranas do estudo (QM, QMG, QMGC) nas dimensões de 6 mm no fundo de cada poço. As células foram cultivadas **em contato direto com as membranas** 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.

4.4.1.2 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 fluorescente foi lido na excitação de 485/20 e emissão: 528/20.

4.4.2 Cepas e preparação do inóculo

As cepas de bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923 foram disponibilizadas pelo Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, Campus de São Paulo. Para a preparação do inóculo foi utilizado tubos de ensaio contendo meio Infusão Cérebro-Coração (*Brain Heart Infusion - BHI - Kasvi®*, Paraná, Brasil), preparado conforme recomendação do fabricante. Os inóculos foram incubados em estufa bacteriológica à temperatura de 37°C por 24 horas, segundo as Normas Internacionais de Biossegurança em todo o procedimento. Utilizou-se a concentração de 8×10^8 UFC/mL, fornecida através da escala nefelométrica de *Mc Farland*.

4.4.3 Avaliação da zona de inibição

Para a realização das análises da zona de inibição (ZI), foram utilizadas placas de *petri* estéreis com dimensões 90 x15 mm contendo com Agar Infusão Cérebro - Coração (*Brain Heart Infusion Agar - BHI Agar- Kasvi®*, Paraná, Brasil). Uma alíquota de 50 µl do inóculo foi devidamente distribuída por toda placa em uma concentração final de 1×10^8 UFC/mL para ambas as cepas, *E. coli* e *S. aureus*. As membranas de 6 mm referente a cada grupo experimental foram colocadas em triplicata da placa de cultura. As zonas de inibição foram determinadas após o período de incubação de 24 h de incubação em estufa bacteriológica à temperatura de 37°C. Utilizou-se o *software Image J* (*National Institutes of Health, USA*) para quantificação do diâmetro da zona de inibição.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para todas as variáveis. Para os testes de atividade metabólica e proliferação celular foi utilizado testes de ANOVA *Two Way* com *post hoc* de *Sidak*. Para análise 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 as estatísticas das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

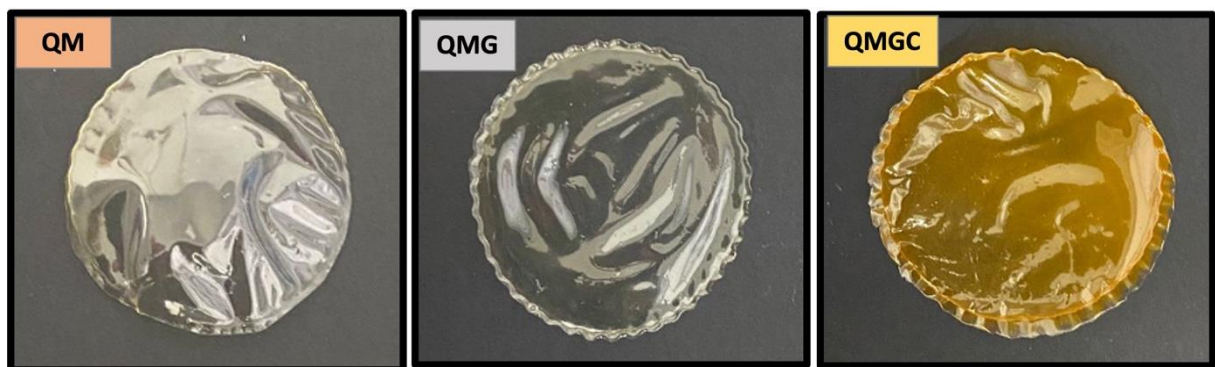
5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

5.1.1 Formações das membranas

As membranas foram removidas das placas de silicone após a secagem em temperatura ambiente e fluxo com ar. Como ilustrado na figura 1, foi formado membranas com características homogêneas, com ausência de bolhas e autossustentáveis. Na membrana QM foi observado uma coloração mais transparente quando comparado com as demais membranas. A membrana QMG observou-se uma coloração mais branca opaca e a QMGC uma coloração mais amarelada devido à característica do pigmento curcumina.

Figura 1- Fotomicrografias representativas das membranas formadas

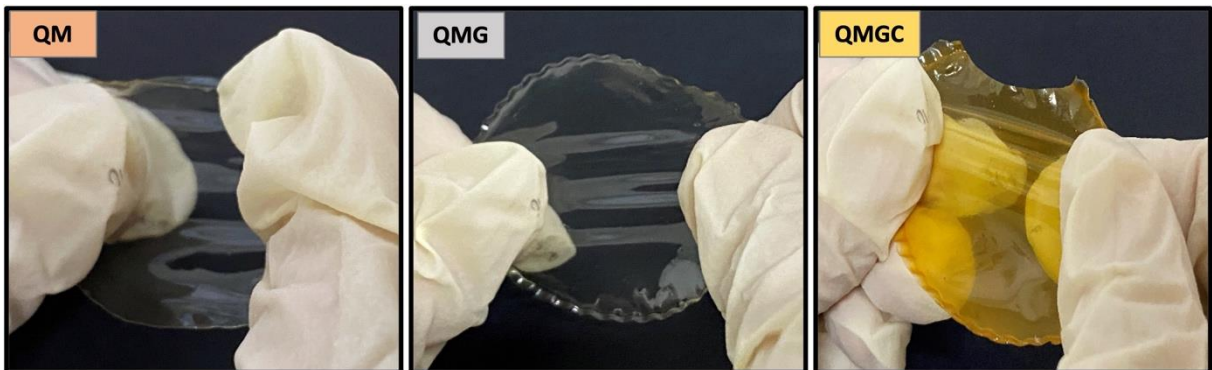


Membrana de Quitosana Média (QM); Membrana de Quitosana Glicerol (QMG);
Membrana de Quitosana Glicerol e Cúrcuma (QMGC)

Fonte: Autoria própria.

Na realização de uma força de tração similar em todas as membranas. Pode-se observar claramente na figura 2 a diferença entre o comportamento mecânico nas membranas QM e QMG e QMGC. As membranas QMG e QMGC apresentaram maior flexibilidade quando comparada a membrana QM.

Figura 2- Fotomicrografias representativas da força de tração



A) Membrana de Quitosana Média (QM); B) Membrana de Quitosana Glicerol (QMG); C) Membrana de Quitosana Glicerol e Cúrcuma (QMGC)

Fonte: Autoria própria.

5.1.2 Medidas de espessura

Os valores de espessura obtidos foram de $55 \pm 10 \mu\text{m}$ para a membrana QM, $40 \pm 10 \mu\text{m}$ para a membrana QMG e $56 \pm 8 \mu\text{m}$ para a membrana QMGC. Nenhuma diferença estatística foi observada entre as espessuras das membranas avaliadas.

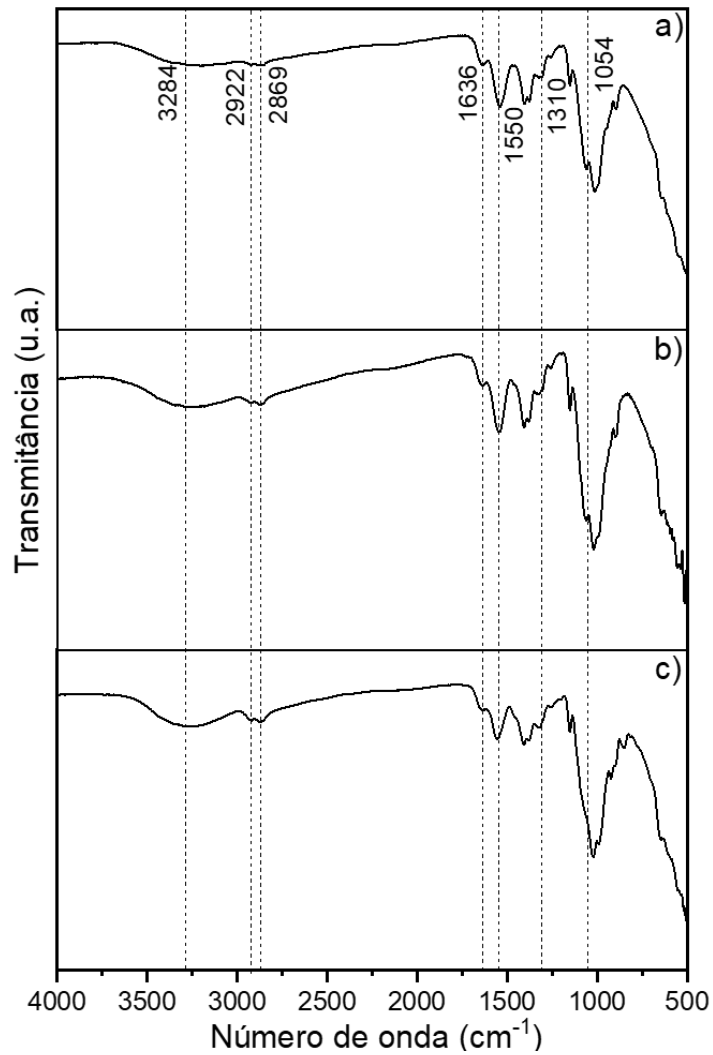
5.1.3 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Na figura 3 pode-se observar a presença de espectros na região do infravermelho para as membranas de QM, QMG e QMGC.

Em todas as membranas foi observado bandas vibracionais típicas correspondentes aos grupos químicos formadores dos 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 1636 cm^{-1} à banda de vibração relacionada ao grupo amida I (C = O alongamento) da quitosana; em 1550 cm^{-1} à banda de amida II (deformação angular N-H) da quitosana; em 1310 cm^{-1} à banda de amida III (C = O-NH₂ deformação axial) da quitosana; e em 1054 cm^{-1} observa-se uma banda correspondente à deformação angular do C-O da quitosana (Figura 3A, B e C).

Nas membranas QMG e QMGC é possível observar que a banda centrada em 3284 cm^{-1} (atribuída à deformação OH) e aquelas centradas em 2922 cm^{-1} e 2869 cm^{-1} (atribuídas às cadeias alquílicas) têm sua intensidade aumentada devido a adição de glicerol (Figura 3B e 3C). Nenhuma banda adicional foi observada.

Figura 3- Espectros de FTIR para membranas formadas



a) Membrana de Quitosana Média (QM); b) Membrana de Quitosana Glicerol (QMG);
c) Membrana de Quitosana Glicerol e Cúrcuma (QMGC)

Fonte: Autoria própria.

5.1.4 Ângulos de contato

Os valores do ângulo de contato (θ) entre a água e as membranas nas membranas QMG e GMGC foram menores, θ de $85^\circ \pm 1,0$ e θ de $88^\circ \pm 0,5$, respectivamente, quando comparado aos valores da membrana QM apresentando θ de $104^\circ \pm 0,5$.

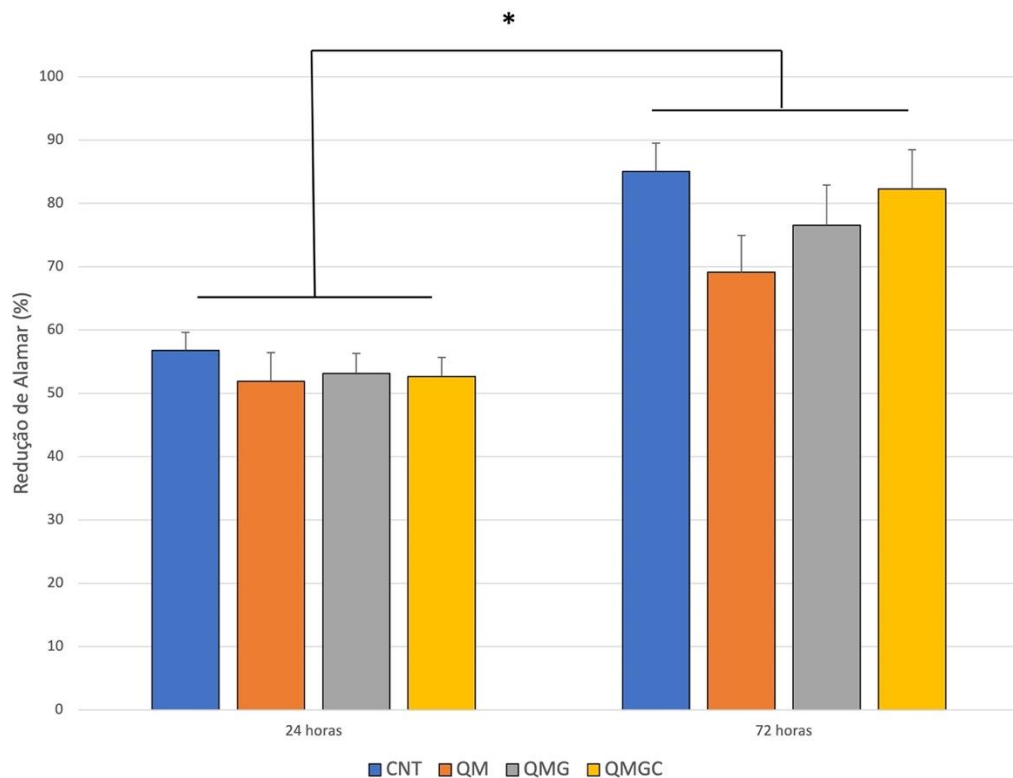
5.2 AVALIAÇÕES *IN VITRO*

5.2.1 Atividade metabólica/viabilidade

A figura 4 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.

Foi observado um aumento da atividade metabólica/viabilidade quando no período de 72 horas quando comparado ao tempo experimental de 24 horas. Na comparação entre os grupos, nenhuma diferença estatística foi observada entre as membranas avaliadas em ambos os períodos experimentais avaliados.

Figura 4- Gráfico de redução de *AlamarBlue*® de células L929 no período de 24 e 72 horas



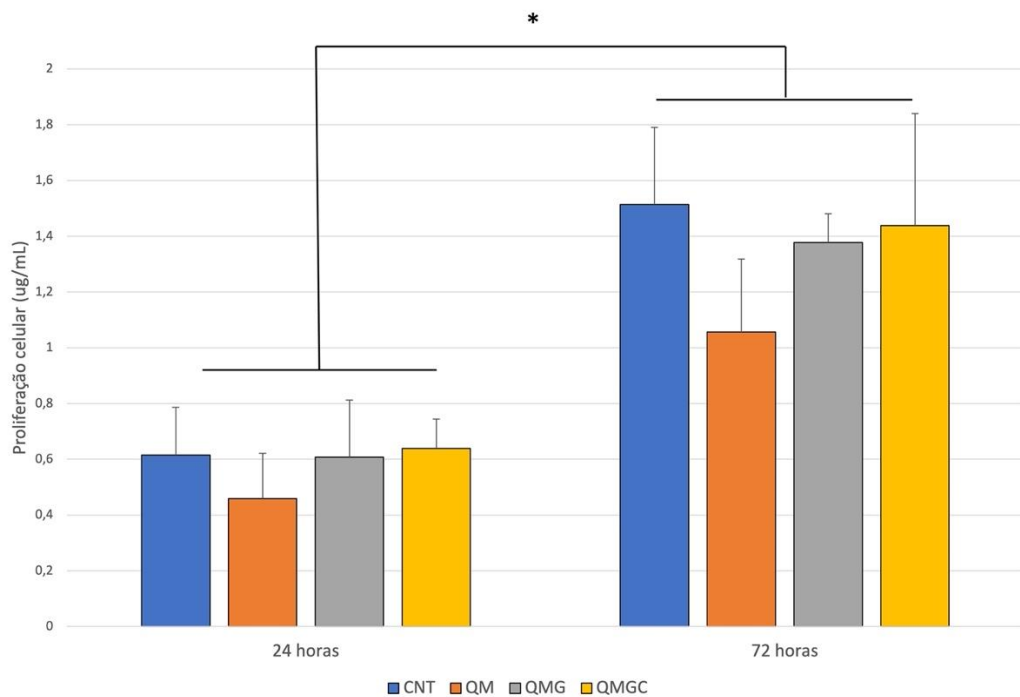
Controle (CNT); Membrana de Quitosana Média (QM); Membrana de Quitosana Glicerol (QMG); Membrana de Quitosana Glicerol e Cúrcuma (QMGC); * diferença estatística entre os períodos de 24 horas vs 72 horas.

Fonte: Autoria própria.

5.2.2 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 demonstrados na Figura 5. Houve um aumento significativamente da proliferação celular de todas as membranas no período experimental de 49 horas quando comparado ao período de 24 horas. Na análise entre os grupos, não foi observado diferença estatística entre as membranas avaliadas em ambos os períodos avaliados.

Figura 5- Gráfico representativo dos valores da proliferação celular de L929 no período de 24 e 72 horas



Controle (CNT); Membrana de Quitosana Média (QM); Membrana de Quitosana Glicerol (QMG); Membrana de Quitosana Glicerol e Cúrcuma (QMGC); * diferença estatística entre os períodos de 24 horas vs 72 horas.

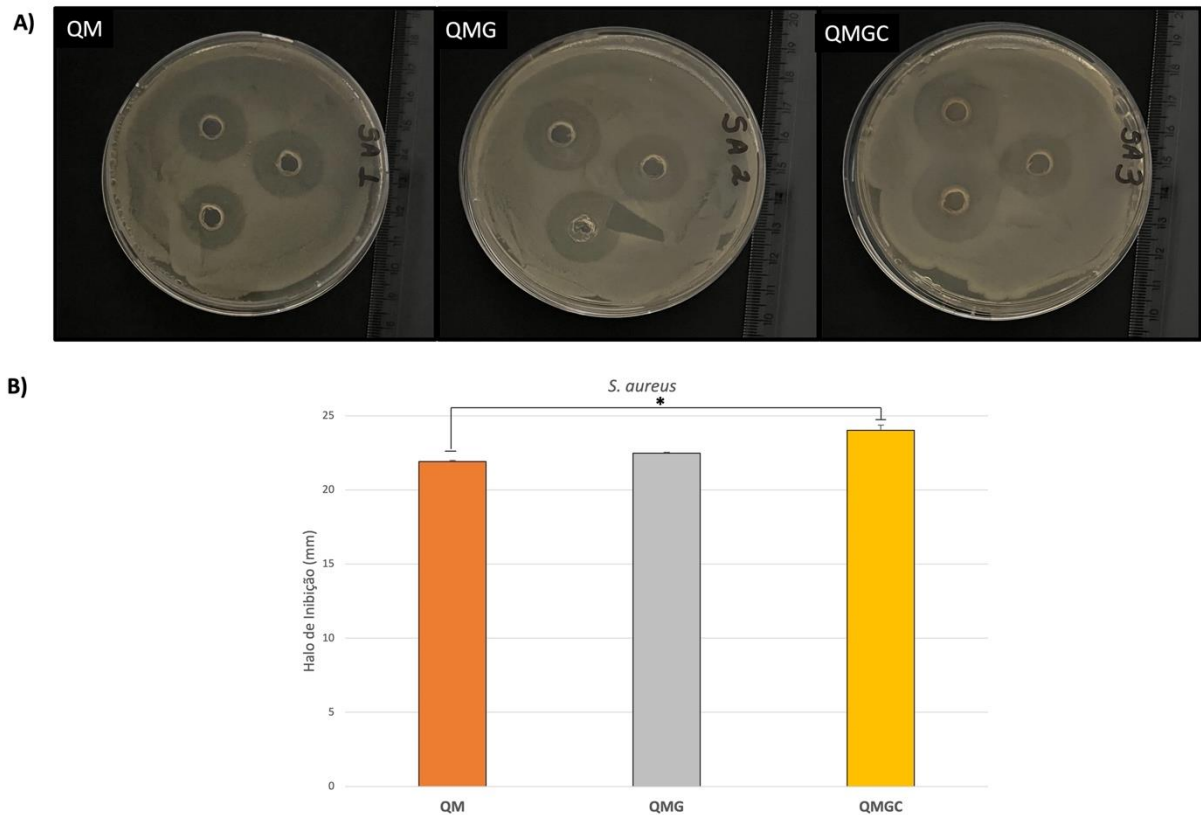
Fonte: Autoria própria.

5.2.3 Zona de inibição

A figura 6A mostra as imagens representativas do ensaio microbiológico de 24 horas de cultivo de *S. aureus* em contato com os diferentes tipos de membrana. Para todas as membranas foi possível verificar a presença de uma zona de inibição.

A análise quantitativa da zona de inibição mostrou que houve uma maior distância da zona de inibição na membrana QMGC (24,02 mm) quando comparado a membrana QM (21,90 mm) (Figura 6B).

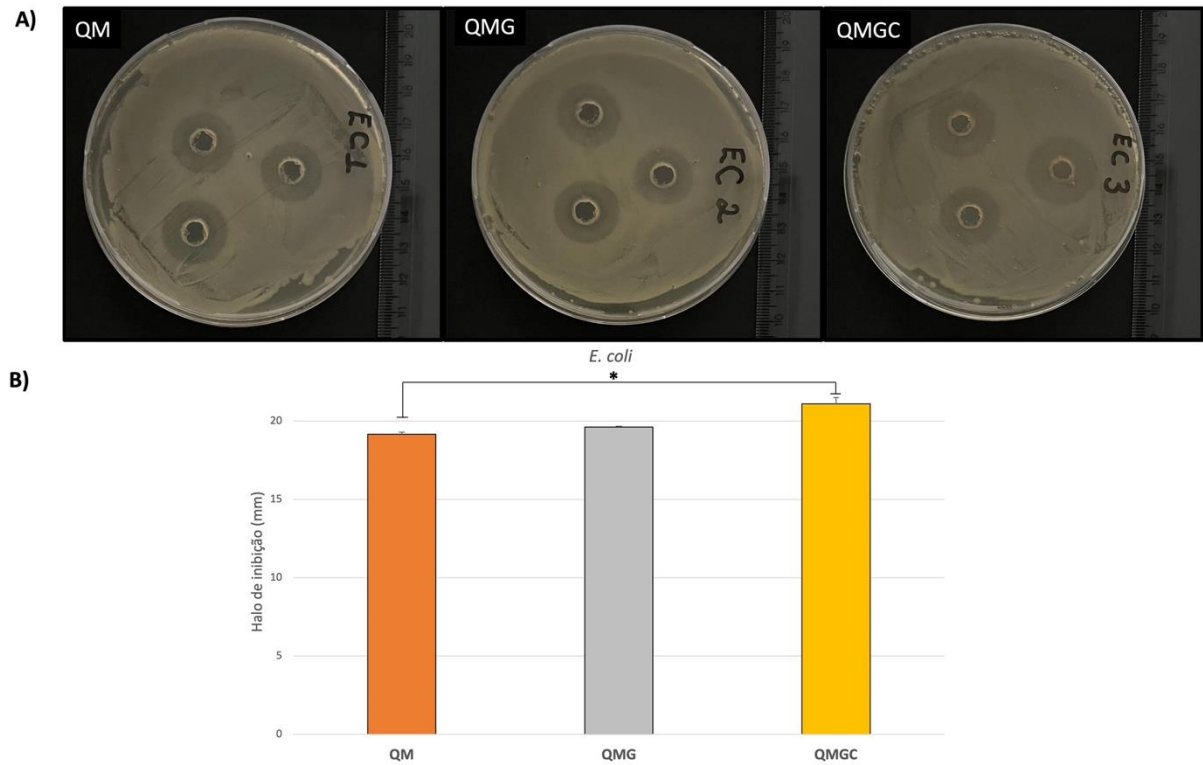
Figura 6- Fotomicrografias representativas e gráfico da zona de inibição de *S. aureus*



Membrana de Quitosana Média (QM); Membrana de Quitosana Glicerol (QMG); Membrana de Quitosana Glicerol e Cúrcuma (QMGC)

Fonte: Autoria própria.

Imagens representativas do ensaio microbiológico de 24 horas de cultivo de *E. coli* em contato com os diferentes tipos de membrana está demonstrado na Figura 7A. Verifica-se a presença da zona de inibição em todas as membranas avaliadas. Um aumento da zona de inibição na membrana de QMGC (21,09 mm) quando comparado a membranas de QM (19,1 mm) (Figura 7B).

Figura 7- Fotomicrografias representativas e gráfico da zona de inibição de *E. coli*

Membrana de Quitosana Média (QM); Membrana de Quitosana Glicerol (QMG); Membrana de Quitosana Glicerol e Cúrcuma (QMGC)

Fonte: Autoria própria.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo propõe desenvolver, através da técnica de *casting* e caracterizar membranas a base de quitosana associada a cúrcuma, assim como, avaliar a citotoxicidade em linhagem de fibroblastos e o efeito antimicrobiano para *S. aureus* e *E. coli*. Os resultados mostram que todas as membranas apresentaram ser autossustentáveis, homogêneas e flexíveis, sendo as membranas QMG e GMGC as mais flexíveis e mais hidrofílicas em comparação a membrana QM. Bandas vibracionais para grupos químicos de quitosana foram observadas em todas as membranas e de glicerol nas membranas QMG e QMGC. Com relação à avaliação de citotoxicidade todas as membranas apresentam maiores valores de atividade metabólica/viabilidade, assim como uma maior proliferação de células de fibroblastos no período experimental de 72 horas quando comparado ao de 24 horas de cultivo. Ademais, todas as membranas avaliadas promoveram formação de zona de inibição na em *S. aureus* e *E. coli*, mostrando efeito antimicrobiano com destaque para a membrana acrescida de cúrcuma.

A alta incidência de feridas cutâneas observada nos últimos anos impacta na importância de desenvolvermos estratégias terapêuticas que otimizem o reparo. Embora exista a manufatura de diversas estruturas a base de quitosana em várias aplicações biomédicas, há uma carência na literatura de estudos que verificaram o potencial biológico provenientes de membranas a base de quitosana produzidas através da técnica de *casting* associada a cúrcuma, com a finalidade de desenvolver biomateriais seguros e efetivos para uma prática clínica.

Atualmente, é possível encontrar uma diversidade de métodos utilizados no desenvolvimento de biomembranas a base de quitosana (KRAVANJA et al., 2019; UL-ISLAM et al., 2023). No presente estudo, a técnica de *casting* foi empregada devido ao fato de ser um método de baixo custo, boa reprodutibilidade e por ser capaz de formar membranas favoráveis e de rápida obtenção (CARONI et al., 2021; PACHECO et al., 2023), assim como observado nas membranas obtidas. Foi observado que a adição de glicerol na composição da membrana alterou as propriedades mecânicas das mesmas, deixando-as mais flexíveis. Sabe-se que as moléculas de glicerol possuem a habilidade de se posicionar entre as cadeias polimérica da quitosana e desfaz as ligações intercadeias de hidrogênio do polímero, afastando as cadeias de quitosana e aumentando a sua flexibilidade, fato que justifica o uso da molécula de

glicerol como plastificante no processo de formação de membrana (CARONI et al., 2021; CHEN et al., 2018).

Com a intenção de caracterizar os grupos químicos dos materiais das membranas foi utilizado os espectros FTIR. As bandas vibracionais típicas correspondentes aos grupos químicos formadores de quitosana e glicerol observada no presente estudo foram atribuídas de acordo com a literatura (DESBRIE et al., 2001). Interessantemente, as bandas vibracionais referentes a cúrcuma, ou seja, em 3330 cm^{-1} , alongando a vibração dos grupos-O-H; em 3055 cm^{-1} , vibração de alongamento de ligações C-H aromáticas; em 2955 cm^{-1} , vibração assimétrica dos grupos-CH₃-; em 2930 cm^{-1} , -CH₂ alongamento assimétrico; em 1627 cm^{-1} , alongamento da ligação C=O; em 1587 cm^{-1} , C-C vibração de ligação em aromáticos; em 1510 cm^{-1} , vibração de ângulo de deformação do anel benzênico; em 1427 cm^{-1} , deformação angular do grupo CH₂; em 1368 cm^{-1} , deformação angular do grupo CH₃ e em 1118 cm^{-1} , estiramento das ligações C-O (DE DEUS et al., 2021), não foram observadas ao espectro das membrana avaliadas, provavelmente devido à baixa proporção do material na membrana em relação à massa da quitosana.

De acordo com Abd El-Hack et al. (2020), os materiais considerados ideais para serem usados no tratamento de feridas devem ser flexíveis, estáveis e ter a capacidade de manter a ferida úmida e absorver o exsudato. Assim, a hidrofiliidade das membranas foi verificada no presente estudo por meio da análise de ângulo de contato entre as membranas e a água. É conhecido que os materiais que apresentam ângulo de contato $\theta \leq 90^\circ$ é considerado hidrofílico, $150^\circ \geq \theta > 90^\circ$ hidrofóbico e $180^\circ \geq \theta > 90^\circ$ superhidrofóbico (LAW, 2014). Desta forma, podemos considerar que a membrana produzida apenas por quitosana de média massa molar ($\theta = 104^\circ$) indicando característica hidrofóbica, apesar da presença dos grupos amino e hidroxila com caráter hidrofílico nas cadeias de quitosana (CARONI et al., 2021). Já as membranas acrescidas de glicerol ($\theta = 85^\circ$) e glicerol e cúrcuma ($\theta = 88^\circ$) apresenta característica hidrofílica, provavelmente devido à presença de grupos hidroxila, ou seja, grupos químicos de caráter hidrofílico na estrutura do glicerol e da cúrcuma (PACHECO et al., 2023). Destaca-se que durante a realização dos experimentos, quando a água era gotejada na superfície das membranas, uma pequena deformação na superfície do material pode ser observada, sugerindo forte interação entre os materiais. Desta forma, acredita-se que as membranas de quitosana de média massa

molar acrescidas de glicerol e cúrcuma possuam aspectos importantes nas aplicações práticas de materiais como curativos de feridas.

Como descrito anteriormente, para que ocorra um reparo bem-sucedido de uma ferida cutânea é necessário que haja uma sincronia de diversos eventos moleculares e celulares (RIPPA; KALABUSHEVA; VOROTELYAK, 2019; WOODLEY, 2017). Assim, é de extrema importância a utilização de biomateriais que influencie positivamente a atividade metabólica de células responsáveis pelo reparo e não prejudique suas funções (GOODARZI et al., 2018). No presente estudo, as análises de citotoxicidade celular foram realizadas pelos métodos de redução de *AlamarBlue*® e pelo método *Picogreen*®. Ambos objetivamente avaliaram as diretrizes dos fibroblastos (célula da derme metabolicamente ativa) mimetizando as situações e condições *in vivo* de um tratamento de uma ferida com biomaterial.

No ensaio de atividade metabólica/viabilidade e de proliferação foi verificado que todas as membranas avaliadas proporcionaram um aumento de ambas as variáveis avaliadas no período de cultivo de 72 horas das células L929 quando com 24 horas de cultivo. Esses resultados indicam que as membranas produzidas em todas as composições químicas não apresentaram citotoxicidade, sendo assim, compatíveis com as células da linhagem L929. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Ueno et al. (2001), nos quais avaliaram o efeito quitosana de baixa massa molar em células L929 (fibroblastos), e não observaram citotoxicidade para essa linhagem celular. Ainda, Howling et al. (2015) avaliaram membranas de quitosana de baixa e alta massa molar em fibroblastos dérmicos e não observaram citotoxicidade significativa para essa linhagem celular, semelhante ao observado no presente estudo.

A proliferação celular é um evento chave no processo de reparo de feridas, sendo a proliferação dos fibroblastos especialmente importante durante a segunda fase, quando há a necessidade de formação do tecido de granulação e contração da ferida. Estudos desenvolvidos por BEKALE; AGUDELO; TAJMIR-RIahi et al. (2015) e FANG et al. (2001), mostraram que as massas molares da quitosana impactam suas interações com proteínas e bicamadas fosfolipídicas, onde essas funções podem mediar importantes funções intracelulares. O aumento na proliferação de fibroblastos, como o observado no presente estudo, é possível sugerir que a quitosana de média massa molar pode exercer uma melhor eficiência no processo de reparo de uma ferida cutânea, visto que poderá potencializar a formação do tecido de granulação,

acelerando o fechamento da ferida, conforme previamente descrito em estudos prévios (PACHECO et al., 2023; RIBEIRO et al., 2021; UENO et al., 1999).

Ainda, é possível mencionar que o ambiente úmido e rico em nutrição de feridas cutâneas proporciona condições desejáveis para o crescimento de microrganismos patógenos. Sabe-se que as infecções bacterianas ocorrem quando o sistema imunológico do hospedeiro não consegue eliminar todas as bactérias invasoras. Portanto, as propriedades antibacterianas dos curativos precisam ser seriamente consideradas. Dentro deste contexto, é possível evidenciar os efeitos antimicrobianos da quitosana na inativação de bactérias, fungos, protozoários e vírus relatados por vários autores em diferentes situações clínicas, sendo essa propriedade muito interessante para aplicação como curativo bioativo (LI et al., 2019; VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017; XING et al., 2009). Entretanto, devido as diferentes massas molares testadas torna-se difícil a padronização e a escolha de quitosana ideal para desinfecção de micro-organismos presentes em feridas cutâneas. Ainda, estudos que utilizaram a quitosana para essa finalidade, não deixam claro as massas molares, e, muitas vezes produzem resultados dúbios e passíveis de questionamentos, dificultando consolidação do uso de biomembranas na prática clínica de tratamento de feridas (TANGSADTHAKUN et al., 2007; ZHENG et al., 2016). Especificamente, alguns estudos mostraram o potencial da quitosana em eliminar *E. coli* e *S. aureus* (XING et al., 2009), corroborando com os achados do presente estudo, onde todas as membranas a base de quitosana de média massa molar foram capazes de produzir uma zona de inibição no cultivo de *S. aureus* e *E. coli*, inferindo a ação antimicrobiana das membranas. Cabe enfatizar que a membrana de quitosana de média massa molar quando associado ao glicerol e a cúrcuma proporcionaram uma maior zona de inibição de ambas as bactérias (Gram-positiva e Gram-negativa) no período experimental avaliado. Existem hipóteses para esclarecer o mecanismo antimicrobiano evidenciadas no presente estudo. Devido à maior mobilidade das cadeias de quitosana na presença das moléculas de glicerol, a mesma interage com glicolipídeos, glicoproteínas ou certos aminoácidos que estão presentes da parede da célula bacteriana e ocasiona o rompimento da estrutura e a morte imediata do micro-organismo. Ademais, a maior zona de inibição observado na membrana acrescida de cúrcuma pode ser justificado pela ação fotodinâmica da curcumina que produz altas concentrações de ROS, potencializando a ruptura da membrana celular, aumentando a sua eficácia no efeito antimicrobiano (ABDULRAHMAN et al., 2020).

Como é conhecido que *S. aureus* e *E. coli* são bactérias prevalentes em infecções de pele, as membranas de quitosana de média massa molar associado ao glicerol e a cúrcuma avaliadas no presente estudo mostram-se promissoras para a aplicação clínica.

Desta forma, o presente estudo fornece importantes dados sobre o desenvolvimento de membranas de baixo custo e sobre os efeitos da quitosana de média massa molar acrescidas ou não de glicerol e cúrcuma no tratamento de feridas cutâneas crônicas infectadas. Destaca-se que é o primeiro ensaio *in vitro* investigando a quitosana de média massa molar tanto na citotoxicidade de fibroblastos (L929) e assim como a efetividade em *S. aureus* e *E. coli*. Cabe destacar que as membranas acrescidas de glicerol apresentaram maior flexibilidade e características hidrofílicas, propriedades importantes para o reparo, e as membranas com cúrcuma promoverem ação antimicrobiana adequada.

Assim, como parte do esforço contínuo em obter biomembranas promissoras, o presente estudo recomenda que as biomembranas produzidas através da técnica de *casting* a quitosana associada a cúrcuma possa ser utilizada como biomateriais seguro para o tratamento de feridas cutâneas, visto que não mostram citotoxicidade celular, promoveram ação antimicrobiana, além de ser bastante econômico, podendo levar a uma redução acentuada de adversidades e custos médicos.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo apresentamos evidências de que as membranas produzidas pela técnica de *casting* a base de quitosana são autossustentáveis, homogêneas e flexíveis, não apresentaram efeito citotóxico para as células da linhagem L929, possuem potencial antimicrobiano e que a membrana associada a cúrcuma apresenta o melhor potencial reparador. Este tipo de evidência experimental é necessário para o desenho de ensaios clínicos envolvendo o uso de membranas como potenciais biomateriais para uso como curativos funcionas de feridas cutâneas.

REFERÊNCIAS

- ABDULRAHMAN, H. et al. Curcumin induced photodynamic therapy mediated suppression of quorum sensing pathway of *Pseudomonas aeruginosa*: An approach to inhibit biofilm in vitro. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, 2020.
- ABD EL-HACK, M. E. et al. Propriedades antimicrobianas e antioxidantes da quitosana e seus derivados e suas aplicações: uma revisão. **Jornal Internacional de Macromoléculas Biológicas**, v. 164, p. 2726-2744, 2020.
- 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.
- AKABERI, M.; SAHEBKAR, A.; EMAMI, S. A.. Turmeric and curcumin: from traditional to modern medicine. **Studies on Biomarkers and New Targets in Aging Research in Iran: Focus on Turmeric and Curcumin**, p. 15-39, 2021.
- AKBIK, D. et al. Curcumin as a wound healing agent. **Life sciences**, v. 116, n. 1, p. 1-7, 2014.
- ARAÚJO, C.; LEON, L. L. **Biological Activities of Curcuma longa L. Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 723-728, 2001.
- ARDA, O.; GÖKSÜGÜR, N.; TÜZÜN, Y. **Basic histological structure and functions of facial skin. Clinics in Dermatology**, jan. 2014.
- BALAGANGADHARAN, K.; DHIVYA, S.; SELVAMURUGAN, N. Chitosan based nanofibers in bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules** Elsevier B.V., 2017.
- BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, 2012.
- BEKALE, L.; AGUDELO, D.; TAJMIR-RIahi, H. A. Effect of polymer molecular weight on chitosan-protein interaction. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 125, p. 309–317, 2015.
- BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Strategies to overcome the polycation dilemma in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** Elsevier B.V., 2018.
- CARONI, J. G. et al. Chitosan-based glycerol-plasticized membranes: bactericidal and fibroblast cellular growth properties. **Polymer Bulletin**, v. 78, n. 8, p. 4297–4312, 2021.
- CHEN, M. et al. Hydrogen bonding impact on chitosan plasticization. **Carbohydrate Polymers**, v. 200, p. 115–121, 2018.
- DE DEUS, W. F. et al. Curcuminoid-Tailored Interfacial Free Energy of Hydrophobic Fibers for Enhanced Biological Properties. **ACS Applied Materials and Interfaces**, 2021.

- DESBRIE, J. et al. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, 2001.
- FAN, Z. et al. Chitosan-based hemostatic hydrogels: The concept, mechanism, application, and prospects. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1473, 2023.
- FAN, Z. et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of curcumin on acute lung injury in a rodent model of intestinal ischemia reperfusion by inhibiting the pathway of NF-Kb. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 4, p. 3451, 2015.
- FANG, N. et al. Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1161-1168, 2001.
- FARHADIHOSSEINABADI, Behrouz et al. Crosstalk entre a quitosana e as vias de sinalização celular. **Ciências da Vida Celulares e Moleculares**, v. 2697-2718, 2019.
- FENG, P. et al. Chitosan-based functional materials for skin wound repair: Mechanisms and applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 650598, 2021.
- GOODARZI, P. et al. Tissue engineered skin substitutes. **Cell Biology and Translational Medicine, Volume 3: Stem Cells, Bio-materials and Tissue Engineering**, p. 143-188, 2018.
- GOPINATH, D. et al. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. **Biomaterials**, v. 25, n. 10, p. 1911–1917, 2004.
- GUEST, C.; SAHEBKAR, A. **Studies on Biomarkers and New Targets in Aging Research in Iran**. Springer International Publishing, 2021.
- GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314-321, 2008.
- 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.
- JIA, S. et al. Intravenous curcumin efficacy on healing and scar formation in rabbit ear wounds under nonischemic, ischemic, and ischemia-reperfusion conditions. **Wound Repair and Regeneration**, v. 22, n. 6, p. 730–739, 2014.
- JOE, B.; VIJAYKUMAR, M.; LOKESH, B. R. Biological Properties of Curcumin-Cellular and Molecular Mechanisms of Action. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2004.
- LUTOMSKI, J.; KEDZIA, B.; DEBSKA, W. Wirkung des aethanolextraktes und aktiver Substanzen aus Curcuma Longa auf Bakterien und Pilze. **Planta Medica**, v. 26, n. 05, p. 9-19, 1974.
- KAMINAGA, Y. et al. Production of unnatural glucosides of curcumin with drastically enhanced water solubility by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. **FEBS Letters**, v. 555, n. 2, p. 311–316, 2003.

KASSEM, A.; AYOUB, G. M.; MALAEB, L. Antibacterial activity of chitosan nano-composites and carbon nanotubes: A review. *Science of the Total Environment*. **Elsevier B.V.**, 2019.

KRAVANJA, G. et al. Chitosan-based (Nano) materials for novel biomedical applications. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1960, 2019.

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

LEONG, H. N. et al. Management of complicated skin and soft tissue infections with a special focus on the role of newer antibiotics. **Infection and drug resistance**, p. 1259-1274, 2018.

LI, X. et al. Supramolecular antibacterial materials for combatting antibiotic resistance. **Advanced Materials**, v. 31, n. 5, p. 1805092, 2019.

LUNDEVIG, D. M. S. et al. Cytoprotective responses in HaCaT keratinocytes exposed to high doses of curcumin. **Experimental Cell Research**, v. 336, n. 2, p. 298–307, 2015.

MEHRABANI, D. et al. The healing effect of curcumin on burn wounds in rat. **World journal of plastic surgery**, v. 4, n. 1, p. 29, 2015.

MOHANTY, C.; DAS, M.; SAHOO, S. K. Sustained wound healing activity of curcumin loaded oleic acid based polymeric bandage in a rat model. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 10, p. 2801–2811, 2012.

MOKHTARI, M.; RAZZAGHI, R.; MOMEN-HERAVI, M. The effects of curcumin intake on wound healing and metabolic status in patients with diabetic foot ulcer: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 4, p. 2099–2107, 2021.

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.

ORTINES, R. V. et al. Neutralizing alpha-toxin accelerates healing of *Staphylococcus aureus*-infected wounds in nondiabetic and diabetic mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. 10.1128/aac.02288-17, 2018.

PACHECO, K. M.L. et al. Membranas à base de quitosana e quitosana/cúrcuma para cicatrização de feridas: produção, caracterização e aplicação. **Jornal Internacional de Macromoléculas Biológicas**, v. 253, p. 127425, 2023.

PAKIZEH, M.; MORADI, A.; GASSEMI, T. Extração química e modificação de quitina e quitosana de cascas de camarão. **European Polymer Journal**, v. 110709, 2021.

PANG, C. et al. An overview of the therapeutic potential of regenerative medicine in cutaneous wound healing. **International Wound Journal**, v. 14, n. 3, p. 450-459, 2017.

- PARADA, E. et al. Microglial HO-1 induction by curcumin provides antioxidant, antineuroinflammatory, and glioprotective effects. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 59, n. 9, p. 1690–1700, 2015.
- REZAIE, F.; MOMENI-MOGHADDAM, M.; NADERI-MESHKIN, H. Regeneration and repair of skin wounds: various strategies for treatment. **The international journal of lower extremity wounds**, v. 18, n. 3, p. 247-261, 2019.
- RIBEIRO, J. C. V. 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.
- RIPPA, A. L.; KALABUSHEVA, E. P.; VOROTELYAK, E. A. Regeneration of dermis: Scarring and cells involved. **Cells**, v. 8, n. 6, 2019.
- RODRIGUES, M. et al. Wound Healing: A Cellular Perspective. **Physiol Rev**, v. 99, p. 665–706, 2019.
- SEN, C. K. Human wounds and its burden: an updated compendium of estimates. **Advances in wound care**, v. 8, n. 2, p. 39-48, 2019.
- TANGSADTHAKUN, C. et al. The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 18, n. 2, p. 147–163, fev. 2007.
- TEJADA, S. et al. Wound healing effects of curcumin: A short review. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 17, n. 11, p. 1002-1007, 2016.
- TOLAIMATE, A. et al. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. **Polymer**, v. 41, n. 7, p. 2463-2469, 2000.
- UENO, H. et al. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. **Biomaterials**, v. 20, n. 15, p. 1407-1414, 1999.
- UENO, H. et al. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. **Biomaterials**, v. 22, n. 15, p. 2125-2130, 2001.
- UL-ISLAM, M. et al. Chitosan-based nanostructured biomaterials: synthesis, properties, and biomedical applications. **Advanced Industrial and Engineering Polymer Research**, 2023.
- VAUGHN, R. et al. Potential role of curcumin against biofilm-producing organisms on the skin: A review. **Phytotherapy research**, v. 31, n. 12, p. 1807-1816, 2017.
- VAUGHN, A. R.; BRANUM, A.; SIVAMANI, R. K. Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on skin health: a systematic review of the clinical evidence. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 8, p. 1243-1264, 2016.
- VERLEE, A.; MINCKE, S.; STEVENS, C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydrate polymers**, v. 164, p. 268-283, 2017.

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

WANG, Y. H. et al. Evaluation of Chitosan-based Dressings in a Swine Model of Artery-Injury-Related Shock. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

WONG, R. et al. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 92–98, 2016.

WOODLEY, D. T. Distinct fibroblasts in the papillary and reticular dermis: implications for wound healing. **Dermatologic clinics**, v. 35, n. 1, p. 95-100, 2017.

XING, K. et al. Oleoyl-chitosan nanoparticles inhibits *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by damaging the cell membrane and putative binding to extracellular or intracellular targets. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, n. 2–3, p. 127–133, 2009.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133-1174, 2015.

ZHENG, B. et al. Molecular weight-dependent immunostimulative activity of low molecular weight chitosan via regulating NF-KB and AP-1 Signaling Pathways in RAW264.7 macrophages. **Marine Drugs**, v. 14, n. 9, 2016.