

---

UNIVERSIDADE BRASIL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

CAMPUS ITAQUERA

CONCEIÇÃO DE MARIA AGUIAR CARVALHO

**UTILIZAÇÃO DE QUITOSANA E PIPERINA NA ALIMENTAÇÃO  
DE ANIMAIS: ANÁLISE DA EFICÁCIA NO REPARO DE LESÕES  
CUTÂNEAS EM RATOS**

USE OF CHITOSAN AND PIPERINE IN ANIMAL FEED: ANALYSIS  
OF EFFECTIVENESS IN REPAIR OF SKIN LESIONS IN RAT

São Paulo – SP

2024

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

### CONCEIÇÃO DE MARIA AGUIAR CARVALHO

# UTILIZAÇÃO DE QUITOSANA E PIPERINA NA ALIMENTAÇÃO DE ANIMAIS: ANÁLISE DA EFICÁCIA NO REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS EM RATOS

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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Pavinatto da Costa  
**Orientadora**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carla Roberta Tim  
**Coorientadora**

São Paulo – SP

2024

**FICHA CATALOGRAFICA**

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

C322u CARVALHO, Conceição de Maria Aguiar.

Utilização de quitosana e piperina na alimentação de animais: análise da eficácia no reparo de lesões cutâneas em ratos / Conceição de Maria Aguiar Carvalho -- São Paulo: Universidade Brasil, 2024.  
69 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 da Costa.  
Coorientação: Profa. Dra. Carla Roberta Tim.

1. Quitosana. 2. Piperina. 3. Liofilização. 4. Gavagem 5. Lesões cutâneas. I. Costa, Adriana Pavinatto da Costa. II. Tim, Carla Roberta. III. Título.

CDD 660.63

# TERMO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE  
BRASIL

## TERMO DE APROVAÇÃO

CONCEIÇÃO DE MARIA AGUIAR CARVALHO


### “UTILIZAÇÃO DE QUITOSANA E PIPERINA NA ALIMENTAÇÃO DE ANIMAIS: ANÁLISE DA EFICÁCIA NO REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS EM RATOS”

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

Documento assinado digitalmente  
 **ADRIANA PAVINATTO DA COSTA**  
Data: 28/05/2024 09:42:28-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof.(a) Dr.(a) Adriana Pavinatto da Costa (Presidente-Orientadora)

Documento assinado digitalmente  
 **ANA LAURA MARTINS DE ANDRADE**  
Data: 28/05/2024 14:33:39-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

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

Documento assinado digitalmente  
 **LAURITA DOS SANTOS**  
Data: 28/05/2024 18:13:14-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof(a). Dr.(a) Laurita dos Santos (Membro Interno)

Documento assinado digitalmente  
 **RAFAELA CRISTINA SANFELICE**  
Data: 28/05/2024 16:48:32-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof(a). Dr.(a) Rafaela Cristina Sanfelice (Membro Externo)

Documento assinado digitalmente  
 **SAMUEL GUERRA TORRES**  
Data: 29/05/2024 08:30:39-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof(a). Dr.(a) Samuel Guerra Torres (Membro Externo)

Campus Itaquera  
Rua Carolina Fonseca, 584, Itaquera - São Paulo/SP | 08230-030  
WhatsApp: (11) 4858-6272  
[www.ub.edu.br](http://www.ub.edu.br)



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

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

---

---

---

São Paulo, 28 de junho de 2024

Campus Itaquera  
Rua Carolina Fonseca, 584, Itaquera - São Paulo/SP | 08230-030  
WhatsApp: (11) 4858-6272  
[www.ub.edu.br](http://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**

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO**

**Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWWdo  
Respectivo 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.

Título do Trabalho: ***“UTILIZAÇÃO DE QUITOSANA E PIPERINA NA ALIMENTAÇÃO DE ANIMAIS: ANÁLISE DA EFICÁCIA NO REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS EM RATOS”***

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

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Autor(es):

Discente: **CONCEIÇÃO DE MARIA AGUIAR CARVALHO RA: 1818303-8**

Assinatura: \_\_\_\_\_



Documento assinado digitalmente  
CONCEIÇÃO DE MARIA AGUIAR CARVALHO  
Data: 29/05/2024 13:18:51-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador(a): Prof(a). Dr.(a) Adriana Pavinatto da Costa (Presidente-Orientadora)

Assinatura: \_\_\_\_\_



Documento assinado digitalmente  
ADRIANA PAVINATTO DA COSTA  
Data: 28/05/2024 09:42:28-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Coorientador(a):

Assinatura: \_\_\_\_\_

São Paulo, 28 de junho de 2024

Campus Itaquera  
Rua Carolina Fonseca, 584, Itaquera - São Paulo/SP | 08230-030  
WhatsApp: (11) 4858-6272  
[www.ub.edu.br](http://www.ub.edu.br)

## **DEDICATÓRIA**

A minha mãe, Teresinha Carvalho, e minha irmã, Gillian Danielle. O amor de vocês é o que me move. Obrigado pela compreensão e carinho durante este período no qual não pude dedicar-lhes a devida atenção.

## AGRADECIMENTOS

A professora Dra. Adriana Pavinatto, por seus ensinamentos, paciência e confiança ao longo desse árduo percurso acadêmico. Obrigada por sua dedicação, que o fez, por diversas vezes, deixar de lado seus momentos de descanso para esclarecer minhas dúvidas e oferecer palavras de apoio e incentivo. Sem sua ajuda, a construção desse trabalho não seria possível.

A professora Dra. Carla Roberta Tim pela disponibilidade de tempo, compartilhamento de saberes e apoio.

Ao professor Dr. Bruno Batista da Silva pela parceria, incentivo e ajuda na produção dos materiais.

Pela colaboração recebida do professor Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho, e todo o suporte fornecido para o desenvolvimento da seção experimental realizada nas instalações do Núcleo de Biotecnologia e Biodiversidade da UESPI.

A Dra. Aline Diolindo, que acreditando em meu potencial, muito me incentivou a iniciar a caminhada rumo a obtenção desse título.

A Universidade Brasil pelos saberes e oportunidades a mim dispensadas.

A Universidade Presbiteriana Mackenzie pela ajuda com a utilização da estrutura laboratorial.

A Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal do Ensino Superior – CAPES – Brasil, pela bolsa concedida para apoio financeiro.

A minha mãe Teresinha, minha irmã, Danielle, e meu irmão, Delson, por desejarem sempre o melhor para mim, pelo esforço que fizeram para que eu pudesse superar cada obstáculo dessa jornada e chegar até aqui. E



principalmente, pelo amor, carinho e credibilidade que em mim depositaram neste e nos demais desafios da minha vida.

A minha Avó e Avô, Maria de Lourdes (in memória) e Delson Reis de Carvalho (in memória), os quais sempre contribuíram, apoiaram, e não mediu esforços para realização de meus estudos. Tenho certeza, que se hoje estivessem entre nós, estariam envaidecidos por mais essa conquista de sua neta.

A todos que contribuíram para a concretização deste trabalho.

Por fim, o agradecimento mais importante: a Deus e Nossa Senhora, por me abençoarem com tantos presentes divinos, me dando talvez, além do que eu possa merecer. Obrigada, meu Pai, por tudo de bom que tenho e que sou. Agradeço também aos santos e anjos, que sempre estão olhando por mim e intercedendo a meu favor. Sem essa força divina, nenhuma conquista seria possível.

Este estudo foi financiado pela coordenação de aperfeiçoamento do pessoal do ensino superior – CAPES – Brasil (código financeiro 001)

## RESUMO

A pele, conhecida como o maior órgão do corpo humano, se destaca por seu papel singular na manutenção da integridade do organismo. Interrupções nas camadas epiteliais são denominadas lesões ou feridas de pele. O reparo de feridas consiste em um mecanismo constituído pelas fases de hemóstase e inflamação, proliferação e remodelação, iniciando imediatamente após a ocorrência da lesão. A necessidade de uma terapêutica eficiente para o cuidado de uma população acometida por lesões é desafio crescente que demanda estratégias inovadoras, eficientes e de custo acessível. Nesse cenário, o presente estudo prevê a avaliação da associação da ação antimicrobiana e reparadora da Quitosana (QUI) com a ação anti-inflamatória da Piperina (PIP) no processo de reparação de lesões cutâneas. Para isso, micropartículas liofilizadas de QUI e PIP foram produzidas e caracterizadas para posterior administração, via gavagem, aos animais com lesão induzida. Após a liofilização, obteve-se 2,4g de QUI e 2,7g de QUI/PIP. Os espectros obtidos através de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) apresentaram bandas de vibração característica dos grupos químicos formadores do material e corroboram com a literatura. As Micrografias Eletrônicas de Varredura (MEV) das amostras em pó mostraram partículas com superfícies relativamente rugosas, enquanto as amostras liofilizadas apresentaram superfícies mais finas e com maior área superficial. Ambos os materiais não apresentam processo de degradação térmica em temperaturas inferiores a 60°C, indicando que permanecem ativos (não degradados) quando submetidos a temperatura corporal animal. A análise qualitativa das lesões, obtidos a partir dos resultados in vivo, não revelou sinais de necrose, odor ou líquido na cavidade da lesão, bem como não acusou presença de fibrose. A análise morfométrica do índice de reparo das feridas, não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos experimentais em todos os períodos estudados. Da mesma forma, através da análise histológica do tecido lesionado não foi possível observar mudanças significativas entre os grupos experimentais.

**Palavras-chave:** Quitosana. Piperina. Liofilização. Gavagem. Lesões cutâneas.

## ABSTRACT

The skin, known as the largest organ in the human body, stands out for its unique role in maintaining the integrity of the organism. Disruptions in the epithelial layers are called skin lesions or wounds. Wound repair consists of a mechanism consisting of the phases of hemostasis and inflammation, proliferation and remodeling, starting immediately after the injury occurs. The need for efficient therapy to care for a population affected by injuries is a growing challenge that demands innovative, efficient and affordable strategies. In this scenario, the present study aims to the evaluation of the association of the antimicrobial and reparative action of Chitosan (Chi) with the anti-inflammatory action of Piperine (PIP) in the process of repairing skin lesions. To this end, lyophilized microparticles of Chi and PIP were produced and characterized for subsequent administration to animals with lesions induced via gavage. After freeze-drying, 2.4g of QUI and 2.7g of Chi/PIP were obtained. The spectra obtained through Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) showed vibration bands characteristic of the chemical groups that form the material and corroborate the literature. Scanning electron micrographs (SEM) of the powdered samples showed particles with relatively rough surfaces, while the freeze-dried samples presented thinner surfaces with greater surface area. Both materials do not present a thermal degradation process at temperatures below 60°C, indicating that they remain active (not degraded) when subjected to animal body temperature. The qualitative analysis of the lesions, obtained from in vivo results, revealed no signs of necrosis, odor or liquid in the lesion cavity, nor did it indicate the presence of fibrosis. The morphometric analysis of the wound repair index showed no statistically significant difference between the experimental groups in all periods studied. Likewise, through histological analysis of the injured tissue, it was not possible to observe significant changes between the experimental groups.

**Keywords:** Chitosan. Piperine. Freeze-drying. Gavage. Skin lesions.

## DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

Devido à grande quantidade de pessoas com feridas ou cortes na pele, é cada vez maior a necessidade de tratamentos baratos e capazes de ajudar na cura dessas lesões. Por esse motivo, este estudo busca comprovar se a ingestão de quitosana juntamente com piperina pode acelerar a cura de feridas. Para produzir a amostra de quitosana foi utilizado 3g de quitosana dissolvida em 300 mL de uma mistura contendo água e ácido acético glacial. Depois, o material foi congelado e passou por um processo chamado liofilização. Tal processo consiste na sublimação (passagem do estado sólido para o gasoso, sem passar pelo líquido) da água congelada. Para a amostra quitosana/piperina, a piperina foi dissolvida e adicionada na etapa de dissolução da quitosana, seguindo o mesmo procedimento utilizado para a quitosana pura. Foram produzidos e caracterizados 2,4g de quitosana e 2,7g de quitosana/piperina. A caracterização da estrutura química dos materiais produzidos está de acordo com a literatura. Na micrografia, antes da liofilização as amostras tinham aparência lisa e uniforme, após liofilização, a superfície ficou mais irregular. A análise térmica indicou que os dois materiais não são destruídos até atingiram a temperaturas de 60°C, ou seja, continuam ativos se ingeridos por animais. Os resultados dos testes em animais demonstraram que a alimentação com o material produzido, durante o período experimental aqui utilizado, não auxiliou o processo de reparação das feridas.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ETAPAS REPARO DA FERIDA .....	24
FIGURA 2 - ESTRUTURAS QUÍMICAS IDEALIZADAS DA QUITINA (A) E QUITOSANA (B), ONDE N É O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO .....	29
FIGURA 3 - FRUTOS FRESCOS (A), SECOS (B) E MOÍDOS (C) DE <i>P.NINGRUM</i> . ESTRUTURA QUÍMICA (D) E CRISTAIS (E) DA AMINA NATURAL PIPERINA .....	35
FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA LIOFILIZADAS .....	40
FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA/PIPERINA LIOFILIZADAS .....	41
FIGURA 6 - ESQUEMA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO ESTUDO.....	44
FIGURA 7 - ESPECTROS DE FTIR PARA QUITOSANA, PIPERINA E QUITOSANA-PIPERINA .....	49
FIGURA 8 - TERMOGRAMA OBTIDO POR DSC PARA QUITOSANA, PIPERINA E QUITOSANA-PIPERINA .....	51
FIGURA 9 - MICROGRAFIAS PARA AMOSTRAS DE QUITOSANA USANDO MAGNIFICAÇÃO DE 500X (A) E 1000X (B) E DE PIPERINA USANDO MAGNIFICAÇÃO DE 500X (C) E 1000X (D).....	53
FIGURA 10 - MICROGRAFIAS PARA AMOSTRAS DE QUITOSANA LIOFILIZADA USANDO MAGNIFICAÇÃO DE 500X (A) E 1000X (B) E DE QUITOSANA-PIPERINA LIOFILIZADA USANDO MAGNIFICAÇÃO DE 500X (C) E 1000X (D) .....	54
FIGURA 11 – EVOLUÇÃO MACROSCÓPICA DAS LESÕES.....	56
FIGURA 12 – ÍNDICE DE REPARO DAS FERIDAS .....	57
FIGURA 13 - ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA .....	58

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CEUA/UESPI	Comissão de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Piauí
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EUA	Estados Unidos da América
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FGDS	Fator de crescimento derivado de plaquetas
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
QUI	Quitosana
GLI	Glicerol
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
kDA	Quilodaltons
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEC	Matriz Extracelular
NOAEL	Nível de Efeitos Adversos não Observados
PIP	Piperina
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
TGF- $\beta$	Fator de Transformação do Crescimento Beta

**LISTA DE SÍMBOLOS**

°C	Grau Celsius
h	horas
kDa	quilodalton
Kg <sup>-1</sup>	quilograma por metro cúbico
kV	quilovolts
mL	mililitros
N <sub>2</sub>	gás nitrogênio
pg	picograma
v/v	volume por volume
µg/ml	microgramas por mililitro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>23</b>
3.1	PELE E REPARAÇÃO DO TECIDO EPITELIAL.....	23
3.1.1	<i>Fase Inflamatória</i> .....	24
3.1.2	<i>Fase Proliferativa</i> .....	25
3.1.3	<i>Fase de Remodelação</i> .....	26
3.2	QUITINA E QUITOSANA .....	27
3.2.1	<i>Caracterização e propriedades da quitosana no reparo tecidual</i> .....	29
3.2.2	<i>Quitosana e a aceleração do processo de reparação tecidual</i> .....	30
3.2.3	<i>Micro e nanoestruturas a base de quitosana para o reparo de pele</i> .....	31
3.3	PIPERINA.....	33
3.3.1	<i>Biossíntese, características e propriedades da piperina</i> .....	34
3.3.2	<i>Interação com outros compostos e toxicidade</i> .....	36
3.4	ABSORÇÃO DA QUITOSANA E PIPERINA NO TRATO GASTROINTESTINAL .....	38
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
4.1	MATERIAIS .....	40
4.2	PRODUÇÃO DAS AMOSTRAS .....	40
4.3	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	41
4.3.1	<i>Espectroscopia na Região do Infravermelho</i> .....	42
4.3.2	<i>Calorimetria Diferencial Exploratória</i> .....	42
4.3.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i> .....	42
4.4	EXPERIMENTOS IN VIVO.....	43
4.4.1	<i>Aspectos éticos e legais</i> .....	43
4.4.2	<i>Delineamento experimental</i> .....	43
4.4.3	<i>Procedimentos anestésicos</i> .....	44
4.4.4	<i>Protocolo de indução da lesão tecidual</i> .....	44
4.4.5	<i>Tratamento</i> .....	45
4.4.6	<i>Análise macroscópica</i> .....	45



4.4.7	<i>Análise morfométrica do Índice de Reparo das Feridas</i> .....	45
4.4.8	<i>Processamento das amostras</i> .....	45
4.4.9	<i>Análise histológica</i> .....	46
4.4.10	<i>Análise estatística</i> .....	46
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	47
5.1.1	<i>Espectroscopia na Região do Infravermelho</i> .....	47
5.1.2	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial</i> .....	50
5.1.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i> .....	52
5.2	TESTES IN VIVO.....	54
5.2.1	<i>Peso Corporal dos animais</i> .....	54
5.2.2	<i>Análise Macroscópica</i> .....	55
5.2.3	<i>Análise Morfométrica</i> .....	56
5.2.4	<i>Análise histológica descritiva</i> .....	57
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Representando 12% do peso seco total do corpo, com aproximadamente 4,5 quilos, a pele é considerada o órgão de maior dimensão do organismo humano (JOHNER; NETO, 2021). Destaca-se por ser uma fronteira mediadora entre o organismo e o ambiente, apresentando funções de singular importância como proteção, regulação da temperatura, excreção, síntese de vitamina D, colesterol e melanina, sendo formada por três camadas: epiderme, derme e hipoderme (FERREIRA *et al.*, 2021).

A perda de sua integridade em decorrência de lesões ou doenças, pode resultar em desequilíbrio fisiológico significativo, culminando em última instância, em incapacidade considerável ou até óbito (CLARK; GHOSH; TONNESEN, 2007). Devido sua contribuição no incremento das taxas de morbidade e mortalidade, as feridas cutâneas vêm chamando a atenção das autoridades em saúde a nível mundial. Nos Estados Unidos (EUA), estima-se que cerca de 6,5 milhões de pessoas possuam feridas crônicas, e que em torno de 25 bilhões de dólares são destinados anualmente para o tratamento de complicações relacionadas a essa categoria de lesão. A incidência de tais danos aos tecidos epiteliais vem também se agravando no Brasil, onde aproximadamente 3% da população tem algum tipo de ferida de pele (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Entendido como um mecanismo complexo constituído por várias fases, o reparo da lesão se inicia imediatamente após a ocorrência da mesma, através de um processo sequencial e coordenado de eventos celulares e moleculares cujo o objetivo primordial é a reestruturação dos tecidos danificados (MIRANDA, 2023).

Exercendo o papel de fonte energética básica para a homeostase celular e fornecimento de nutrientes para a síntese proteica, evidências literárias tem substanciado o entendimento de que um aporte nutricional adequado possa modular a resposta imune e/ou metabólica do organismo influenciando positivamente a terapêutica de lesões de pele (JAUDSZUS *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2012). Aminoácidos como metionina, arginina e cisteína são fundamentais durante a fase inflamatória da lesão. Minerais como selênio, ferro, cobre, manganês e zinco, além de tiamina, ácido ascórbico, ácido pantotênico e outras vitaminas do complexo B são necessários para o bom desenvolvimento da fase

proliferativa. (PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO, 2021). Nesse contexto, entende-se que a alimentação do indivíduo ou a utilização de nutracêuticos possa auxiliar o processo de reparação tecidual.

Oriundo da junção das palavras nutrientes e farmacêuticos (MACHADO; FURINI PUTON; DALLAZEM BERTOL, 2019), o termo nutracêutico foi utilizado pela primeira vez em 1989 pela *Foundation for Innovation in Medicine* (ANDLAUER; FÜRST, 2002). Diz respeito a metabólitos extraídos de diferentes organismos que apresentam propriedades medicinais comprovadas e quando adicionados regularmente aos alimentos tradicionais da dieta, adquirem valor nutricional, proporcionando benefícios à saúde (GIOTTI SALVADOR; CECHINEL-ZANCHETT, 2020; PURI *et al.*, 2022). Podendo abranger desde nutrientes isolados, suplementos comercializados na forma de tabletes, cápsulas e pós, até produtos herbais e alimentos processados, os nutracêuticos vem se desenvolvendo nos últimos anos e impulsionando uma indústria global de milhões de dólares (AGRAWAL, N.; GOYAL, A.; JAIN, 2020; DURAZZO; LUCARINI; SANTINI, 2020; SACHDEVA; ROY; BHARADVAJA, 2020).

No Brasil, a regulação de tais compostos fica a cargo da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que após várias discussões aprovou em 1999 as diretrizes básicas que regulam a utilização desses produtos, sendo as principais a Resolução n° 16/99 e a RDC n° 2/2002, que abrangem respectivamente a venda de alimentos processados e encapsulados, e a utilização do ingrediente isolado (COSTA, N.M. B. COSTA, ROSA, 2010; MACHADO; FURINI PUTON; DALLAZEM BERTOL, 2019). Dentre as classes de produtos que compõem os nutracêuticos e tem propriedades que auxiliam o processo de reparação tecidual, destacam-se os produtos herbais.

O uso de plantas com princípios medicinais (produtos herbais), antissépticos, colágeno biológico, filmes semipermeáveis, enzimas proteolíticas, hidrogéis, fatores de crescimento celular, bandagens e curativos de gaze para proteção e compressão da pele, se apresentam como recursos indicados no tratamento de lesões cutâneas (CHAVES *et al.*, 2014). Diante de tais alternativas, e levando em conta a biodiversidade brasileira e a possibilidade de acesso com custo reduzido, os produtos naturais e seus subprodutos têm sido apresentados como possibilidade de tratamento bastante atrativa para os danos epiteliais (BATISTA *et al.*, 2012).

Nesse contexto, a piperina (PIP), um composto fitoquímico extraído da pimenta-preta, vem despertando atenção devido sua ação terapêutica. Cultivada em regiões tropicais da Indonésia, Brasil e Índia, a *Piper nigrum* (pimenta-preta), pertencente à família Piperaceae vem sendo apontada como uma das especiarias mais utilizadas em todo o mundo. A popularidade dos grãos de pimenta se deve à presença de compostos aromatizantes, que possuem características quentes e picantes, em função da presença do fitoquímico PIP (HAQ *et al.*, 2021). Diferentes revisões destacam a ação curativa e perspectivas de contribuição do composto para a boa saúde. Seus efeitos vão desde a ação antitumoral, anti-hipertensiva, anti-asmática, analgésica, antipirética, antidiarreica, e anti-inflamatória, até seu efeito ansiolítico, antiespasmódico, hepatoprotetor e antidepressivo (SMILKOV *et al.*, 2019).

Além dos produtos herbais, outros tipos de materiais, produtos e tecnologias vêm sendo estudados e desenvolvidos para auxílio no processo de reparação tecidual (NOTODIHARDJO *et al.*, 2020; OU *et al.*, 2021). Dentre as opções que vem sendo estudadas como capazes de promover o reparo de tecidos lesionados, os biopolímeros têm se destacado por sua eficiência. Nesse contexto, destaca-se o uso de quitosana (QUI) e seus derivados (HOWLING *et al.*, 2001; SÁNCHEZ-MACHADO *et al.*, 2022).

A QUI é um biopolímero catiônico obtido principalmente pelo processo de desacetilação da quitina, uma fonte natural renovável. O polímero possui atividade antimicrobiana e pode ser facilmente processado para a produção de filmes, membranas e *scaffolds* porosos (KALAISELVIMARY; RAMESH PRABHU, 2019). Devido às suas características particulares e ausência de toxicidade em células de fibroblastos (FOLLMANN *et al.*, 2016), a QUI pode ser aplicada em lesões teciduais, atuando como agente reparador da epiderme e derme (CARONI *et al.*, 2021).

Nesse cenário, em atendimento a necessidade de estratégias inovadoras e versáteis, de custo acessível, e capazes de contribuir na terapêutica dos cuidados às feridas, o presente estudo prevê a avaliação da associação da ação antimicrobiana e reparadora da QUI com a ação anti-inflamatória da PIP no processo de reparação de lesões cutâneas. Para tanto, micropartículas liofilizadas de QUI e PIP foram produzidas e caracterizadas, para posterior uso na alimentação (como nutracêutico) de animais em experimentos *in vivo*. Supõe-

se que tal associação seja capaz de proporcionar um fechamento rápido da lesão, contribuindo para promoção de um reparo satisfatório e redução na formação de cicatrizes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de micropartículas liofilizadas de QUI e PIP, utilizadas na alimentação de animais, no reparo de feridas de pele.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir micropartículas de QUI e PIP por meio da técnica liofilização.
- Caracterizar as propriedades físico-químicas e morfológicas das amostras produzidas.
- Verificar o potencial de reparo das micropartículas liofilizadas em lesões de pele induzidas em ratos.
- Determinar o reparo das lesões cirúrgicas produzidas através da mensuração macroscópica temporal.
- Avaliar o reparo tecidual por meio de análises morfométricas e histopatológicas.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

A interinidade da pele é essencial para o perfeito desempenho de funções corporais que garantem a manutenção do equilíbrio funcional, ou da homeostasia orgânica, exercendo o papel de barreira física e química, de manutenção do equilíbrio de fluídos, de termorregulação, e de manutenção do sistema nervoso em contato com o meio ambiente (SORG *et al.*, 2017). Portanto, a eficácia do reparo tecidual é apontada como fator primordial para sobrevivência humana na natureza (REINKE; SORG, 2012).

#### 3.1 PELE E REPARAÇÃO DO TECIDO EPITELIAL

A pele possui duas camadas principais. A mais externa, a epiderme, é formada por um epitélio escamoso estratificado queratinizado. A segunda camada, formada por um tecido fibroso-colágeno-elástico que dá suporte a epiderme, e responsável por hospedar vasos, nervos e receptores sensoriais, é denominada derme. Além destas, existe ainda uma terceira camada mais profunda, a hipoderme, que está conectada ao perióstio, sendo constituída principalmente de tecido adiposo (ARDA; GÖKSÜGÜR; TÜZÜN, 2014).

Interrupções ocasionadas na estrutura dos tecidos corpóreos provocadas por traumas de origem química, física ou mecânica, ou ainda por alguma intervenção clínica, são denominadas feridas. Quando tais rupturas ocorrem em uma das camadas da pele, temos uma lesão ou ferida de pele (NOTODIHARDJO *et al.*, 2020; OU *et al.*, 2021).

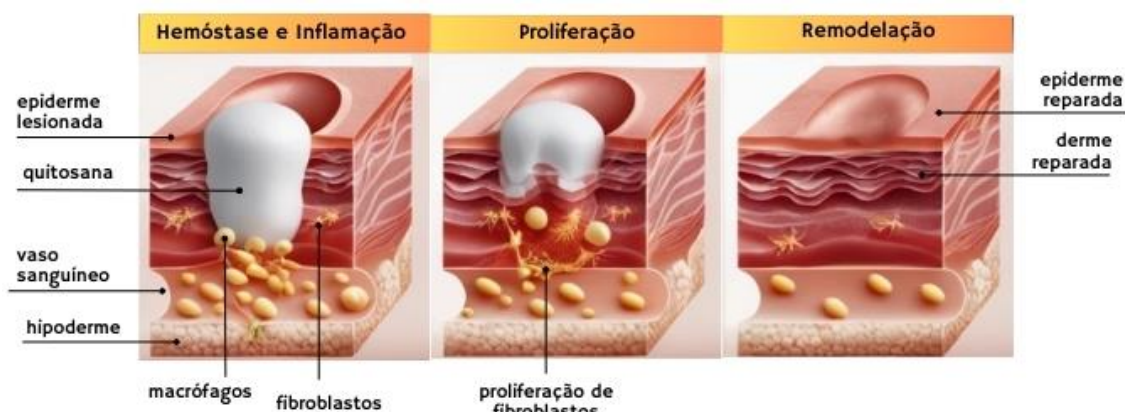
O reparo das lesões cutâneas, entendido como o esforço dos tecidos em restaurar a função e estrutura natural do tecido, envolve um mecanismo de notória complexidade, que além da ativação de mediadores, se processa mediante diversas interações entre o tecido parenquimático, a matriz extracelular e os elementos figurados do sangue (BÁRBARA FLORES FERREIRA SILVA RODRIGUES., 2012; ROSIŃCZUK *et al.*, 2016).

Regeneração e cicatrização (reparação) são os dois principais mecanismos de reparo acionados pelo organismo após a ocorrência da lesão tecidual. O primeiro diz respeito a restauração completa da estrutura do tecido pré-existente, ou seja, a troca do tecido lesionado por um novo tecido, análogo

ao inicial, e recuperação da função e estrutura natural do mesmo. Tal sequência, acontece quando existe integridade da camada basal da epiderme, permitindo que as bordas epiteliais se direcionem para o centro da ferida, fechando rapidamente sua superfície. No mecanismo de cicatrização, como o próprio nome remete, ocorre a formação de uma cicatriz caracterizada pela deposição de colágeno e remodelação tecidual. Para tanto existe a necessidade de uma lesão mais profunda às camadas da pele, sem a possibilidade de restauração das estruturas epiteliais (CARDOSO *et al.*, 2013)

Apesar da não existência de limites muito precisos, tal processo pode ser classificado em fases sobrepostas, a saber: hemóstase; inflamação; proliferação (formação do tecido de granulação, com deposição de matriz extracelular (colágeno, elastina e fibras reticulares); e remodelação. Para fins didáticos, tais processos podem ser divididos em apenas três: hemóstase e inflamação, que formam um estágio único, seguidas de proliferação, e por último, a remodelação tecidual. (OLIVEIRA, I.V.P.M.; DIAS, 2012), como mostra a Figura 1.

Figura 1 - Etapas reparo da ferida



Fonte: Autor

### 3.1.1 Fase Inflamatória

Logo após o acontecimento do dano tecidual, inicia-se um estágio com duração de aproximadamente 72 horas, o qual mescla características tanto da fase hemostática, quanto da fase inflamatória. Em decorrência das alterações no



endotélio, da descontinuidade do vaso e do extravasamento dos seus constituintes, eventos vasoconstrictores são imediatamente iniciados a fim de reduzirem a perda sanguínea para o espaço extravascular. Nesse momento, se inicia a formação do coágulo sanguíneo, composto por fibrina, o qual retoma a homeostase local propiciando um ambiente adequado para liberação de fatores de crescimento pelas plaquetas (GAUGLITZ *et al.*, 2011; OLIVEIRA, I.V.P.M.; DIAS, 2012). A agregação das plaquetas aos leucócitos é aumentada, bem como os níveis de quimosinas, citocinas, e fatores de crescimento. Tais eventos são característicos do processo inflamatório.

Outro ponto importante, destacado pelos autores do trabalho citado acima, é que nessa fase ocorre o direcionamento dos neutrófilos e monócitos para o local da ferida a fim de desbridar a superfície da lesão e realizar a fagocitose dos corpos estranhos presentes no local. Tais células mostram maior pico de atuação no primeiro e segundo dia após a ocorrência da lesão, sendo verificado um maior aporte de macrófagos durante as 24 a 72 horas que seguem. Vale ainda destacar, que os macrófagos são responsáveis por ativar os elementos celulares das fases seguintes, tais como os fibroblastos e células endoteliais.

### **3.1.2 Fase Proliferativa**

A fase proliferativa tem início em aproximadamente 3 dias após a lesão. Estima-se que tenha continuidade ainda por 2 a 3 semanas, marcando o início da formação da cicatriz. Essa fase é dividida em quatro etapas: reepitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno (NAYARA SZWED; LUCIA PEREIRA DOS SANTOS, 2015).

Os autores citados complementam afirmando que, a etapa de reepitelização acontece de maneira precoce quando a membrana basal se encontra íntegra, sendo sua duração de aproximadamente 3 dias. É caracterizada pela migração das células epiteliais em direção superior, e pela restauração das camadas normais da epiderme. Ao contrário, caso a membrana basal esteja lesionada, as células epiteliais que margeiam a ferida iniciam um processo de proliferação, buscando retomar a barreira protetora.

A etapa seguinte é a angiogênese ou neovascularização, marcada pela migração de células endoteliais e desenvolvimento de capilares, essenciais para o processo de reparação (NAYARA SZWED; LUCIA PEREIRA DOS SANTOS, 2015). A principal consequência da angiogênese é a formação do tecido conjuntivo, o qual em virtude da presença de numerosos capilares adquire um aspecto granular, recebendo a denominação de tecido de granulação (OLIVEIRA, I.V.P.M.; DIAS, 2012).

A granulação e a deposição de colágeno marcam o final da fase proliferativa. O PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas), realiza a ativação dos fibroblastos, fazendo com que saiam do estado de quiescência e migrem do tecido vivo para o local da ferida. O Fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) atua induzindo a produção de colágeno tipo I pelos fibroblastos, bem como provocando sua transformação em miofibroblastos, responsáveis por promover o fechamento da lesão (NAYARA SZWED; LUCIA PEREIRA DOS SANTOS, 2015).

### **3.1.3 Fase de Remodelação**

A fase de remodelação é marcada pela produção, depósito e organização do colágeno. O colágeno é uma proteína amplamente encontrada na matriz extracelular (MEC), sendo essencial para a organização e resistência tecidual, se destacando como a mais abundantemente encontrada no tecido conjuntivo em fase de cicatrização (ISAAC C, LADEIRA PRS, REGO FMP, ALDUNATE JCB, 2010).

Durante essa fase, os fibroblastos e macrófagos secretam a collagenase, cuja ação causa um equilíbrio entre a produção e destruição das fibras de colágeno, levando a um aumento da resistência da ferida, sem elevação da quantidade da referida proteína (BRITO, 2016).

Particularmente, na matriz dérmica são encontrados dois tipos de colágenos: o tipo I, que corresponde a 80 a 85% da camada mais profunda da pele, e o tipo III, que representa 15 a 20% da referida camada (ISAAC *et al.*, 2010). O colágeno tipo I mostra um diâmetro total de 1 a 20  $\mu\text{m}$ , estando situado principalmente na derme reticular. Já o colágeno tipo III, exibe menor diâmetro,

ou seja, 0,5 a 2  $\mu\text{m}$ , estando presente na sua maior parte na derme papilar localizada mais superficialmente (GRAY H, 2008).

O primeiro colágeno produzido no processo de reparo tecidual é o do tipo III, que se mostra com menor espessura que o colágeno presente na pele normal. Em sequência, ocorre uma substituição progressiva do colágeno tipo III, pelo colágeno tipo I, o qual se apresenta mais resistente, espesso e organizado nas linhas de tensão. Tais transformações trazem como implicação uma elevação da força tênsil da ferida (SOUZA; CASTRO; SILVA, 2021).

Por fim, as fibras de colágeno se apresentam com maior espessura e mais irregulares. O desenvolvimento de tais características traz como consequência direta um aumento na sua força mecânica, tornando o tecido mais resistente. Com o decorrer do processo, ocorre uma redução na deposição de colágeno e o desaparecimento de boa parte das células, o que resulta, finalmente, na formação do tecido cicatricial (SORG *et al.*, 2017).

### 3.2 QUITINA E QUITOSANA

Conhecida como um dos biopolímeros mais abundantes na natureza, a quitina ou poli-( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glucosamina), tem sua produção anual estimada em aproximadamente um trilhão de toneladas (MORGANTI; COLTELLI, 2019). O polímero é extraído, principalmente, através do processo de desmineralização com ácido clorídrico (HCl) do exoesqueleto de crustáceos, seguido do processo de desproteínização com hidróxido de sódio aquoso (NaOH) (MOHEBBI *et al.*, 2019).

Considerando que 75% da massa corporal total de caranguejos, lagostas e camarões, resulta em subprodutos como casca, espinha dorsal, cauda e cabeça, pode-se inferir que, durante muitos anos a indústria de processamento de frutos do mar gerou significativa quantidade de resíduos (FERNANDO *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2018), os quais na maioria das vezes sofrem deterioração a céu aberto, são queimados, ou simplesmente, devolvidos ao mar, resultando em potenciais problemas ao meio ambiente (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; XU *et al.*, 2013).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), publicou em 2018 o relatório *The State of World Fisheries and*

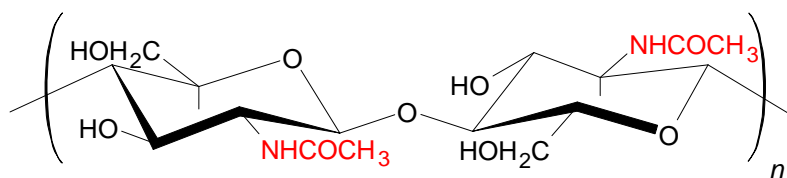
*Aquaculture*, onde atesta que cerca 7 milhões de toneladas de crustáceos são contabilizados como parte da produção mundial de peixes cultivados (FAO, 2018). Desse total, após a retirada da parte comestível, os resíduos de crustáceos se mostram uma significativa fonte de quitina, além pigmentos e outros nutrientes como proteínas e lipídios (GAO *et al.*, 2016; HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; MAO *et al.*, 2017; VÁZQUEZ *et al.*, 2017).

Recentemente, observa-se um aumento do interesse comercial para obtenção de quitina com considerável grau de pureza a partir de fontes não convencionais, como fungos e insetos. Para Muñoz *et al.* (MUÑOZ *et al.*, 2015), a extração fúngica da quitina apresenta como vantagem a ausência da arginina quinase, tropomiosina, e miosina de cadeia leve, presentes nos crustáceos, e que são passíveis de desencadear reações alérgicas. Outra vantagem seria o melhor controle das propriedades físico-químicas durante a produção de quitina advinda de organismos como os fungos, se comparada a obtida de crustáceos, os quais experimentam variação de tais propriedades de acordo como o período de colheita e espécie (HASSAINIA; SATHA; BOUFI, 2018).

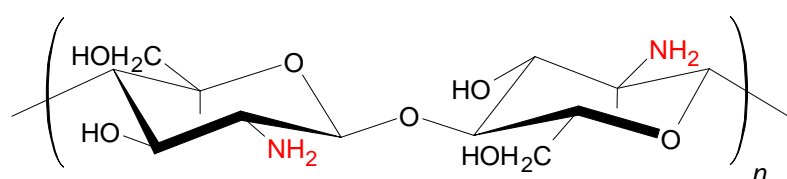
A extração de quitina e outras substâncias derivadas de crustáceos se configuram como uma relevante alternativa de reaproveitamento de material e consequente preservação da natureza. Além disso, a utilização de tais materiais representa um passo relevante na produção de compostos com importantes características biológicas e promissora aplicação em diversos campos (MATICA *et al.*, 2019).

Dentre os derivados da quitina que mais se destacam por suas aplicações biomédicas, cita-se a quitosana, um polissacarídeo linear constituído por unidades de *N*-acetil-glucosamina e *N*-glucosamina. O processo de *N*-desacetilação da quitina é a principal forma de obtenção da QUI, que pode também ser encontrada e extraída da natureza, porém, em pequenas quantidades. Dentre os processos químicos de desacetilação, a reação química através do uso de solução alcalina (NaOH) na proporção de 1:5, a 180 °C (TOLAIMATE *et al.*, 2000) é um dos mais utilizados. A Figura 2 abaixo apresenta as estruturas químicas dos biopolímeros quitina (A) e quitosana (B).

Figura 2 - Estruturas químicas idealizadas da quitina (A) e quitosana (B), onde  $n$  é o grau de polimerização



(A)



(B)

Fonte: Autor

### 3.2.1 Caracterização e propriedades da quitosana no reparo tecidual

A compreensão das características físico-químicas da QUI é essencial para o entendimento de seus atributos funcionais. Um exemplo é a distribuição e porcentagem de grupos amino ao longo da cadeia polimérica, conhecido como grau de acetilação médio ( $\overline{GA}$ ), o qual guarda relação com uma das características mais relevantes do polímero, ou seja, sua natureza policatiônica em meio ácido, resultante da ionização dos grupos amino. Assim, as propriedades funcionais da QUI, como solubilidade, razão de intumescimento, bioatividade e biodegradação, são influenciadas pelo grau de acetilação da mesma (MATICA *et al.*, 2019).

A QUI não é solúvel em água, porém, a presença do seu grupo amino primário possibilita sua solubilidade em ácidos orgânicos como ácido acético, pirúvico, cítrico e láctico, quando diluídos com pH inferior a 6,5 (H. ROLIM *et al.*, 2018). De acordo com sua origem e preparação, a massa molar da QUI pode

variar de 300 a mais de 1000 kDa. Tal característica guarda relação direta com a resposta local após a introdução do polissacarídeo, influenciando na proliferação celular, no aparecimento de edema, bem como na biodegradação do material. Uma menor massa molar resulta em melhor absorção de água e maior solubilidade (VANDEVORD *et al.*, 2002).

Os grupos funcionais amino, acetamido e grupos hidroxila primários e secundários, possibilitam uma fácil modificação do polissacarídeo para obter diferentes derivados e uma grande variedade de aplicações (MOEINI *et al.*, 2020). Tal fato torna a QUI e seus derivados um polímero versátil e promissor para ampla gama de finalidades, devido suas propriedades como: não tóxico, mucoadesivo, antimicrobiano, biocompatível e biodegradável, além do fato de ser atuante no processo de aceleração da proliferação celular (H. ROLIM *et al.*, 2018). Tais propriedades mostram-se bastante vantajosas em aplicações biomédicas, como por exemplo, na engenharia de tecidos, no reparo de feridas ou no desenvolvimento de excipientes para entrega de medicamentos e entrega de genes (CHEUNG *et al.*, 2015).

Uma das propriedades mais interessantes e promissoras da QUI e seus derivados é sua atividade antimicrobiana, a qual atrai especial atenção para sua utilização na indústria alimentícia e na produção de medicamentos (DANG *et al.*, 2018). A ação antimicrobiana da QUI se faz por dois mecanismos principais. O primeiro, caracteriza-se pela interação de grupos aniônicos existentes na superfície celular com grupos catiônicos da QUI. Nesse processo, o incremento na quantidade de carga positiva na forma de  $-NH_3^+$  nas cadeias poliméricas da QUI faz com que ela apresente uma aderência mais forte às paredes celulares das bactérias, mostrando, dessa forma, significativa atividade. Tal interação pode resultar na formação de uma camada impermeável em torno das células bacterianas e inibir o transporte de solutos vitais. Já o segundo mecanismo, tem como característica a inserção da QUI no núcleo da célula e a inibição de sua síntese proteica (BANO *et al.*, 2017).

### **3.2.2 Quitosana e a aceleração do processo de reparação tecidual**

A propriedade imunomoduladora da QUI, manifestada pela capacidade de ativar macrófagos, é um destaque do polímero quando se trata do processo de reparação de feridas. Tal particularidade explica não apenas seu papel na aceleração do reparo de lesões, mas também na biodegradabilidade orgânica do composto. Ao serem ativados pelos oligômeros de quitina e QUI, os macrófagos iniciam a liberação de interleucina-1, estimulando o aumento de fibroblastos e influenciando na estrutura do colágeno. Além disso, também propiciam a liberação de N-acetilglicosaminidase, responsável pela hidrólise da QUI em unidades monoméricas de N-acetilglicosamina e glicosamina. Tais unidades de carboidratos são importantes para a biossíntese do ácido hialurônico e de outros elementos da matriz extracelular produzidas pelos fibroblastos (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A QUI promove a migração de neutrófilos, facilitando a resolução da resposta inflamatória, contribuindo para a aceleração do processo reparador. Além disso, feridas tratadas com QUI mostraram menor grau de fibroplasia (deposição do colágeno de maneira desorganizada), favorecendo a reepitelização com formação de cicatriz lisa (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). Kumar (RAVI KUMAR, 2000) refere um aumento da atividade da lisozima extracelular em cultura de células que receberam tratamento com quitina e seus derivados, tendo como resultado a formação de tecido conjuntivo. Presente naturalmente no fluído extracelular, a lisozima é capaz de despolimerizar com facilidade a quitina e QUI, que atuam como fontes de liberação retardada de monômeros *N*-acetilglicosamina, maior componente do epitélio e cuja presença é fundamental para ocorrência do reparo tecidual das feridas durante o processo de reparo.

### **3.2.3 Micro e nanoestruturas a base de quitosana para o reparo de pele**

Além da multiplicidade de suas propriedades, a adequação para diferentes aplicações como materiais para curativos, transportadores de medicamentos, substitutos ósseos, e dispositivos de biossensor e diagnóstico, tornam a quitosana uma opção de excelência na área biomédica (UL-ISLAM *et al.*, 2023). Especificamente em relação ao reparo de lesões cutâneas, a

versatilidade do polímero permite sua manipulação para o desenvolvimento de estruturas multifuncionais com importante papel no processo de restauração da pele, como por exemplo, hidrogéis, filmes, esponjas, nanopartículas, dentre outros (ALVEN; ADERIBIGBE, 2020).

O principal destaque dos hidrogéis de quitosana no reparo tecidual é sua propriedade de manter a umidade do ambiente da ferida, bem como, em virtude de sua atividade antimicrobiana, servir como obstáculo contra bactérias causadoras de infecções (SOARES *et al.*, 2020). A aplicação promissora dos hidrogéis a base de quitosana em aplicações de engenharia de tecidos é reforçada por Fu; Yang; Guo (FU; YANG; GUO, 2018). No entanto, o autor lembra que, a utilização de quitosana em conjunto com outros polímeros sintéticos ou naturais, mostra maior eficácia se comparada com o uso de hidrogéis puros de quitosana, uma vez que estes últimos apresentam baixa resistência mecânica. Nessa situação, uma alternativa viável seria a incorporação de reticulantes, que possuem a capacidade de melhorar a resistência mecânica dos hidrogéis à base do polímero.

Filmes à base de quitosana se destacam por mostrar boa permeabilidade, ampla área superficial e propriedades antibacterianas únicas, se apresentado como uma escolha potencial à pele artificial e um material relevante para uso como curativos de feridas (VIVCHARENKO *et al.*, 2020). A permeabilidade e hidrofobicidade superficial dos filmes de quitosana podem ser aumentadas sem modificações relevantes da sua estrutura química original por meio da irradiação com raios gama (SALARI *et al.*, 2021). Já a resistência à tração e alongamento na ruptura de tais estruturas, pode ser conseguida com a utilização de cloreto de montmorilonita-cobre. Tais propriedades somadas a capacidade de aceleração significativa da taxa de cicatrização de feridas, faz dos filmes de quitosana um material de comprovada eficiência no reparo tecidual (UMAR *et al.*, 2021).

Em virtude da satisfatória porosidade estrutural, biocompatibilidade e boa absorção de líquidos, as esponjas de quitosana se configuram como um biomaterial propício para hemostasia de feridas (ZHANG *et al.*, 2020). Tais estruturas não apresentam toxicidade, são biodegradáveis, podem carrear medicamentos antibacterianos e proporcionar a coagulação sanguínea em feridas (HU *et al.*, 2018).



Nos últimos anos, os nanomateriais têm ganhado cada vez mais destaque na área biomédica (ZHANG *et al.*, 2019). Nanopartículas de quitosana além de portarem as excelentes propriedades biológicas do polímero, agregam também a capacidade de melhorar a estabilidade dos medicamentos carregados por elas e controlar a taxa de liberação dos mesmos (RIZEQ *et al.*, 2019). A segurança, biocompatibilidade e facilidade de formar complexos proteicos ou de DNA para utilização como sistema de entrega de genes são diferenciais das nanopartículas de quitosana, segundo Bowman e Leão (Bowman e Leão, 2006). Para Xia *et al.* (XIA *et al.*, 2022), os vários atributos conferidos às nanopartículas de quitosana substanciam o seu uso enquanto abordagem terapêutica promissora na terapia direcionada a várias enfermidades na clínica médica.

### 3.3 PIPERINA

A necessidade de uma terapêutica eficiente para o cuidado de uma população acometida por lesões a serem reparadas é um desafio crescente que demanda estratégias inovadoras. Na prática clínica atual, a utilização de produtos naturais, especialmente os derivados de plantas medicinais, vem se revelando uma abordagem bem quista no tratamento de tais danos (CARNEVALLIA; ARAÚJO, 2013).

Produtos naturais possuem enorme diversidade química e estrutural, particularidade que os apresenta como uma fonte praticamente ilimitada para o desenvolvimento de vários compostos (AMIRKIA; HEINRICH, 2015). Nessa visão, as plantas medicinais consolidam historicamente seu valor como fonte de moléculas com potencial terapêutico e, atualmente, simbolizam um importante reservatório para a identificação de novas drogas (ATANASOV *et al.*, 2015). Da mesma forma, ao longo dos anos, muitos alimentos utilizados como parte da rotina dietética de diferentes populações passaram a ser agregados como componente de medicamentos, curativos e cosméticos (CARNEVALLIA; ARAÚJO, 2013). O interesse pela utilização das propriedades curativas dos alimentos também é relatado por Haq *et al.* (HAQ *et al.*, 2021), ao afirmar que devido aos vários benefícios para prevenção de doenças e preservação da saúde, atualmente os compostos funcionais dos alimentos tem atraído a atenção de várias áreas das ciências médicas.

Vários compostos tais como a *Piper nigrum*, *Piper longum*, *Piper chaba*, *Piper guineense* e *Piper sarmentosum* compõem a família Piperaceae. Em tais plantas, além da Piperina (PIP) é possível encontrar vasta gama de compostos bioativos, também conhecidos como nutracêuticos. Flavonoides, fenólicos, amidas, alcaloides, esteróides, neolignanós, lignanos, chalconas e terpenos são exemplos de compostos encontrados nas pimentas. Além destes, também é sabido que a planta é rica em ferro, potássio, e nas vitaminas C e A (EE *et al.*, 2010).

Devido as suas várias propriedades bioativas e a presença dos referidos fitoquímicos, a referida espécie vegetal tem sido usada tradicionalmente como parte da terapêutica popular como anticéptico, diurético, auxiliar da digestão e composto antibacteriano (AHMAD, N., FAZAL, H., ABBASI, BH, FAROOQ, S., ALI, M., & KHAN, 2012). Em sua revisão Carnevallia; Araújo (CARNEVALLIA; ARAÚJO, 2013) afirma que além de ser comumente contemplada na prática culinária, a PIP tem sido utilizada há vários anos como um importante recurso medicinal dos povos indianos, chineses e norte africanos.

As plantas do gênero *Piper* representam mais de 1000 espécies nativas dos trópicos, popularmente conhecidas como pimenteiras ou falsos-jaborandi (COSTA, 2010). No Brasil, a pimenta-do-reino ou pimenta preta (*Piper nigrum*), principal espécie da qual é isolada a PIP, foi inicialmente introduzida pelos escravos no Século XVII, sendo seus frutos, especiarias de relevante interesse comercial desde então. Os Estados do Maranhão, Ceará, Bahia, Pará, Paraíba, Amapá e Espírito Santo, são os que mais se destacam, produzindo toneladas de grãos por hectare anualmente (CARNEVALLIA; ARAÚJO, 2013).

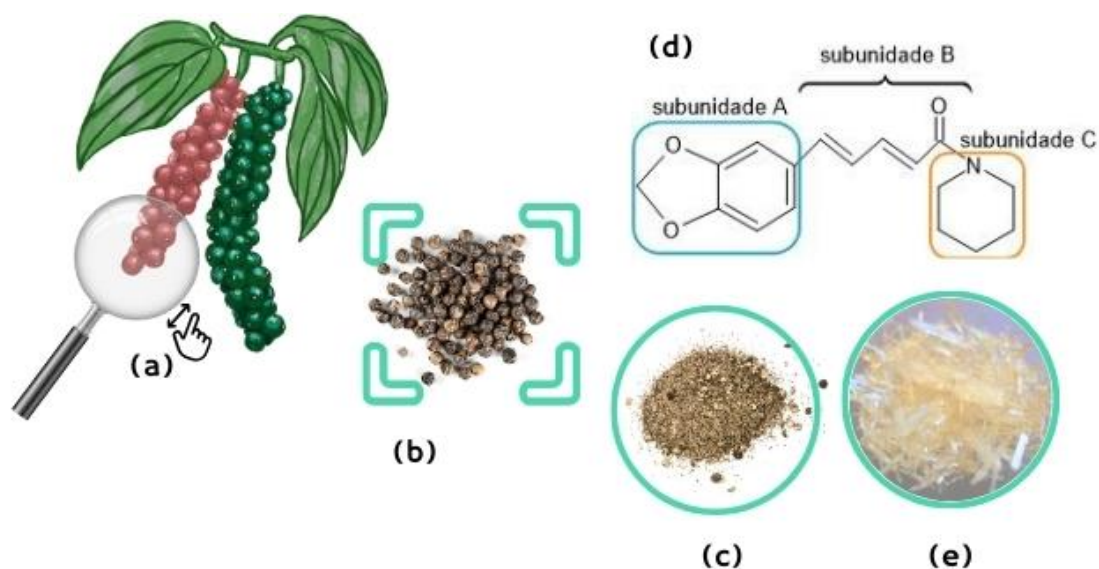
### **3.3.1 Biossíntese, características e propriedades da piperina**

A piperina é obtida da pimenta do reino (*Piper nigrum*), uma planta trepadeira que pode atingir cerca de 4 metros de altura, e cujos os frutos são compostos por sementes com formato globular de coloração vermelha quando maduros e escuros e rugosos quando passam pelo processo de secagem (JÚNIOR, 2021). (Figura 3)

Sendo classificada como uma amina (1-piperoilpiperidina), trata-se de um alcaloide simples e pungente (ASHOKKUMAR *et al.*, 2021), que após sofrer biotransformação se desdobra em ácido pipérico e piperidina (ROGER, 1998).

A Figura 3 mostra os compostos químicos formadores da estrutura da piperina representados respectivamente pelas subunidades A, B e C, bem como os frutos de *P. nigrum* e sua amina natural em forma de cristais. A estrutura química da piperina é composta por um grupo 1,3-benzodioxola (subunidade A – Figura 3 d), situado após uma cadeia de ácido pentadienóico (subunidade B – Figura 3 d) e pela piperidina (subunidade C – Figura 3 d). O ácido pipérico, representado pela porção acil da molécula da piperina, tem como precursor o respectivo derivado cinamoil-SCoA, o qual é biossintetizado a partir do ácido chiquímico. Após reação do derivado cinamoil-SCoA com uma unidade de malonil-SCoA, se obtém o tio éster piperoil-SCoA, que reage com piperidina, formando a piperina (FERREIRA *et al.*, 2012).

Figura 3 - Frutos frescos (a), secos (b) e moídos (c) de *P. nigrum*. Estrutura química (d) e cristais (e) da amina natural piperina



Fonte: Autor

Caracterizada como um composto cristalino, que pode apresentar diferentes colorações, podendo ser incolor, amarelo-pálido ou esbranquiçado, a piperina apresenta ponto de fusão entre 128° e 132°C, e mostra boa solubilidade

em etanol, clorofórmio, ácido acético e benzeno, sendo levemente solúvel em éter etílico e insolúvel em água (SAHU; CHOURASIYA; GAJBHIYE, 2012).

Após o isolamento e caracterização completa, a PIP apresenta como ações terapêuticas de maior relevância: capacidade antioxidante e antilipídêmica (DHIVYA *et al.*, 2017), anti-inflamatória (ELKADY; TAWFIK, 2018), antihiperlipidêmica (MAEDA *et al.*, 2018), imunossupressora (RODGERS *et al.*, 2016), neuroprotetora e antitumoral (WANG-SHENG *et al.*, 2017). Suas propriedades antipirética, analgésica, anticonvulsivante, antifúngica, bactericida, reparadora de feridas, antiespasmódica, antidiarreica, antiparasitária, como também o aumento na taxa metabólica, contribuindo para perda de peso, são também propriedades relevantes do composto (BONTEMPO, 2007).

Poucos ainda são os trabalhos publicados que trazem a ação da PIP no processo de reparação de pele. Porém, outras propriedades do composto como redução do processo inflamatório em quadros de osteoartrite (YING *et al.*, 2013), ação antifúngica (SILVA NETA, 2019), diminuição dos parâmetros lipídicos, com exceção do colesterol do tipo HDL (THIRUMALAI; TAMILSELVAN; DAVID, 2014), e efeito preventivo no desenvolvimento de câncer de pulmão (SELVENDIRAN; BANU; SAKTHISEKARAN, 2004) são bem substanciadas pela literatura.

### **3.3.2 Interação com outros compostos e toxicidade**

Em relação a interação com outros compostos, de acordo com Khan *et al.* (KHAN *et al.*, 2010), a PIP aumenta a biodisponibilidade de diversas drogas no organismo. Atribui-se tal incremento a rápida absorção orgânica do composto, que ao atravessar a barreira intestinal, forma complexos de fármacos não polares e solutos, os quais tendenciam o aumento da permeabilidade entre as barreiras celulares (CARNEVALLIA; ARAÚJO, 2013). Entre os fármacos cujo o aumento da concentração plasmática é observado quando associado a piperina, cita-se o antiarrítmico, Esparteína; o mucolítico, Vasicina (ATAL; ZUTSHI; RAO, 1981); o anti-hipertensivo, Propranolol; o antiasmático, Teofilina e o antiepilético, Fenitoína (BANO *et al.*, 1991).

Derosa e colaboradores (DEROSA; MAFFIOLI; SAHEBKAR, 2016) afirmam que, a PIP tem sido empregada também para aumentar a farmacotécnica, isto é, a bioatividade ou biodisponibilidade, de vários agentes nutracêuticos como curcumina, betacaroteno, barbitúricos, coenzima Q10, quercetina, resveratrol, e piridoxina. Em estudo recente sobre a avaliação dos efeitos protetores da quercetina, realizado em ratos induzidos ao desenvolvimento de Parkinson, foi possível demonstrar a capacidade da PIP de potencializar os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetor do composto.

A toxicidade que a PIP apresenta aos organismos é uma das características mais relevantes para a avaliação da dosagem do composto. Em humanos, a principal via de exposição a PIP é a ingestão dietética. Logo, o padrão alimentar e o consumo total diário, são fatores que podem variar significativamente à exposição ao composto. Como exemplo, pode ser citado a alimentação dos países asiáticos, onde, a fim de conferir sabor característico às preparações, alimentos consumidos no próprio domicílio ou obtidos em restaurantes, cadeias alimentares ou vendedores de rua, utilizam grande quantidade de especiarias, em especial, a pimenta do reino. Por conseguinte, tais regiões mostram um consumo de piperina acima da média, se comparado a outras localidades. Vale ressaltar que, a piperina pode ainda estar presente no cotidiano alimentar dos indivíduos como agente aromatizante de alimentos industrializados, em concentrações que podem variar amplamente de 0,4-6 ppm (em doces) a 640 ppm (em alguns produtos assados).

Tendo em conta que as oleorresinas de pimenta preta apresentam cerca de 40% de PIP, pode-se inferir que um indivíduo consome aproximadamente cerca de  $1 \text{ pg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  de PIP, sendo o Nível de Efeitos Adversos não Observados (NOAEL) para ingestão da PIP em até  $5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (HAQ *et al.*, 2021). Tal dado mostra que o consumo regular de pimenta preta não apresenta toxicidade.

Já em relação a animais, estudos não acusam ações tóxicas a nível hepático e renal (CARDOSO, 2005), bem como não apresenta potenciais efeitos citotóxicos (REN; LIANG, 2018) e nem imunotóxicos (DOGRA; KHANNA; SHANKER, 2004).

### 3.4 ABSORÇÃO DA QUITOSANA E PIPERINA NO TRATO GASTROINTESTINAL

Segundo Tunland; Meyer (TUNGLAND; MEYER, 2002), quitosana, quitina, colágeno e condroitina são entendidos como componentes das fibras de origem animal, que por sua vez, pertencem ao grupo das fibras alimentares. O autor complementa lembrando que tais nutrientes, também denominados de fibras dietéticas, tem como principal característica sua resistência a ação das enzimas digestivas humanas.

Corroborando com o autor acima, Damian (DAMIAN *et al.*, 2005) ressalta que, a indigestibilidade no trato gastrointestinal superior (boca, faringe, esôfago, estômago) é uma das principais particularidades da fisiologia digestiva da quitosana. Já em relação a sua passagem pelo estômago, Azevedo (AZEVEDO *et al.*, 2007) levanta outro ponto relevante ao afirmar que, devido ao ambiente ácido característico do estômago, o polímero apresenta a capacidade de adsorver parte das gorduras, formando uma espécie de “esponja”. Isso ocorre em decorrência da sua elevada densidade de cargas positivas, que lhe confere a habilidade de se ligar aos lipídeos (moléculas de gordura de natureza negativa).

No intestino grosso, a exemplo de outras fibras dietéticas, apesar de não estar sujeita à digestão por enzimas, a quitosana pode ser metabolizada e sofrer degradação pelas hidrolases produzidas por certas bactérias da parte final desse órgão (BARRETT, 2015), sendo parcial ou totalmente fermentada, convertida em ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) e gases (hidrogênio, metano e dióxido de carbono), e ainda, servir como fonte energética para a microflora do cólon intestinal (CUMMINGS; MACFARLANE; ENGLYST, 2001). Já no intestino delgado, a quitosana procede de maneira similar a uma resina de troca iônica, ligando-se a ânions hidrofóbicos, como os ácidos biliares, formando micelas. Tal ação diminui a absorção do polímero, fazendo com que seja excretado nas fezes (GIROTTI *et al.*, 2017).

No que diz respeito a absorção da piperina, Srinivasan (SRINIVASAN, 2007) relata que após a ingestão dietética, os princípios pungentes presentes na pimenta preta, ativam as secreções gástricas e estimulam a produção e liberação da bile, rica em sais biliares. O autor complementa afirmando que, em sequência

a piperina é absorvida no intestino e rapidamente metabolizada. E que, após a absorção no referido órgão, devido a sua não solubilidade em água, necessita de um transportador, sendo a albumina sérica apontada como o principal carregador sanguíneo do composto (SURESH *et al.*, 2007). Assim, sua metabolização é feita através da desmetilação do seu grupamento metilendióxido. Essa biotransformação é realizada, em sua maioria, pelo sistema microssomal do citocromo P-450 das células do Fígado (FRANÇA *et al.*, 2021).

Enriquecendo informações sobre o processo digestório e absorptivo da piperina, Platel e Srinivasan (PLATEL; SRINIVASAN, 2001) complementam ratificando que, a piperina dietética tem como particularidade a capacidade de reduzir significativamente o trânsito alimentar gastrointestinal e que tal fato se correlaciona com sua influência benéfica nas enzimas digestivas ou na secreção biliar. Ainda em relação a absorção do composto, Smilkov *et al.* (SMILKOV *et al.*, 2019) referem que, após sua completa conversão metabólica, a piperina é excretada via fecal, não havendo detecção urinária do composto. O autor enfatiza que, os achados relativos aos processos de digestão, absorção e metabolização da piperina em humanos originaram-se em grande parte de estudos realizados em animais.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

As amostras de QUI de média massa molecular ( $\overline{M}_w = 274\ 000\ \text{g/mol}$  e  $\overline{M}_n = 136\ 000\ \text{g/mol}$ ) e PIP 97% foram obtidas comercialmente da empresa Sigma-Aldrich, São Paulo – SP, Brasil. O ácido acético e água ultrapura foram obtidos da LabSynth (São Paulo, Brasil) e utilizados conforme recebidos.

### 4.2 PRODUÇÃO DAS AMOSTRAS

Para obtenção das micropartículas de QUI e QUI/PIP liofilizadas, 3 g de QUI de média massa molecular (Sigma-Aldrich®) foi solubilizada em 300 mL de solução aquosa de ácido acético glacial (Sigma-Aldrich) 1% (v/v) com o auxílio de um agitador magnético (IKA® RCT basic), utilizando velocidade de agitação constante de 660 RPM pelo período de 24 horas. Após solubilização, a amostra foi fracionada em porções de 20 a 30mL em béqueres e congeladas a  $-20^\circ\text{C}$ . Após o congelamento, as amostras foram liofilizadas em um liofilizador de bancada (Terroni® Enterprice) por 24 horas. O material obtido foi triturado utilizando um moinho (Phillips® RI2103) e acondicionado em frasco inviolável e com sachê de sílica para evitar umidade. O processo acima é descrito no fluxograma da Figura 4.

Figura 4 - Fluxograma do processo de obtenção das micropartículas de quitosana liofilizadas



Fonte: Autor



Para a amostra QUI/PIP, adicionou-se PIP dentro do seu limite de solubilidade 0,04g/L – 0,012g na etapa de solubilização de QUI em solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) e seguiu-se com o mesmo procedimento utilizado para a amostra de QUI pura. O rendimento do processo foi aproximadamente 88,6% em massa. O processo de obtenção da amostra de quitosana/piperina liofilizadas é mostrado no fluxograma da Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma do processo de obtenção das micropartículas de quitosana/piperina liofilizadas



Fonte: Autor

Ao final obteve-se um total de 2,4g de QUI e 2,7g de QUI/PIP. Para alimentação dos animais, as amostras de QUI e QUI/PIP foram solubilizadas, em 120 e 130 mL de água filtrada, respectivamente, através de agitação. As soluções foram acondicionadas em geladeira para posterior administração, via gavagem, aos animais.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram caracterizadas por Microscopia de Varredura Eletrônica, Calorimetria Diferencial Exploratória e Espectroscopia na Região do Infravermelho.

#### **4.3.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho**

A espectroscopia FTIR (na região do infravermelho – IV) foi utilizada para identificar as estruturas químicas dos componentes das amostras. Os espectros foram obtidos usando o Modo de Reflectância Atenuada (ATR), em equipamento da marca Shimadzu modelo IR PRESTIGE-21.

A aquisição foi realizada inserindo as amostras na superfície do prisma e os espectros foram coletados na faixa de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ . Os resultados obtidos em transmitância foram tratados com software ORIGIN® versão 2019b para atribuição e comparação das bandas entre as amostras e seus componentes.

#### **4.3.2 Calorimetria Diferencial Exploratória**

Curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas em um analisador calorimétrico modelo DSC 2100, acoplados a um analisador térmico TA 2000, fabricados pela empresa TA Instruments. As análises foram realizadas com razão de aquecimento de 5°C  $\text{min}^{-1}$  em atmosfera dinâmica de ar e  $\text{N}_2$ , com vazão de 50 mL  $\text{min}^{-1}$ .

#### **4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura**

A morfologia superficial das amostras foi investigada empregando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A caracterização por MEV foi realizada utilizando equipamento modelo Hitachi - TM-3000, acoplado com sistema para microanálise química por Espectroscopia de Energia Dispersiva – EDS, sendo obtidas imagens usando magnificação de 500X e 1000X. As amostras foram previamente secas em estufa a vácuo a 60°C por 6 h e recobertas com uma camada de ouro. As imagens foram obtidas utilizando-se tensão do feixe em 20 kV.

## 4.4 EXPERIMENTOS IN VIVO

### 4.4.1 Aspectos éticos e legais

O estudo aqui apresentado encontra-se de acordo com os preceitos da Lei número 11.794 de 08 de outubro de 2008, Decreto número 6.899, de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo deferido pela Comissão de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Piauí (CEUA/UESPI) de acordo com o Protocolo número 023005/2022-00 (ANEXO A).

### 4.4.2 Delineamento experimental

Para a realização deste experimento foram selecionados 18 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) fêmeas, com 60 dias de vida, procedentes do Biotério do Núcleo de Biotecnologia e Biodiversidade da UESPI. Os animais permaneceram em gaiolas individuais, de polietileno, devidamente etiquetadas, em temperatura ambiente controlada de 25°C e umidade do ar de 60 %, fotoperíodo de 12 h claro/escuro, recebendo água e alimentação padrão *ad libitum*.

Os animais foram separados aleatoriamente em três grupos experimentais, contendo 6 ratos em cada grupo, sendo:

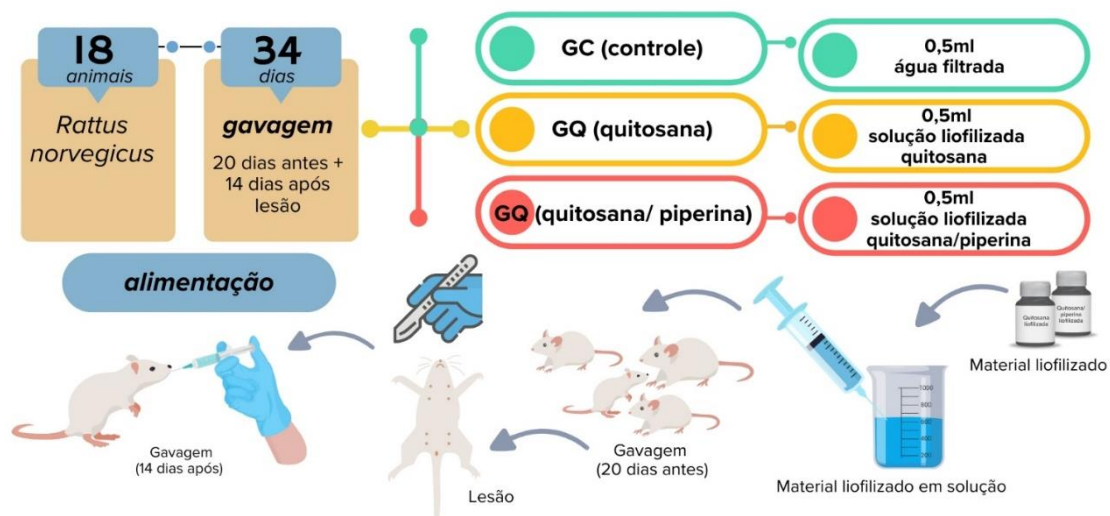
- Controle (GC): animais que receberam via alimentar (gavagem) 0,5 ml de água filtrada por 34 dias (20 dias antes e 14 dias após a realização da lesão).

- Quitosana (GQ): animais que receberam via alimentar (gavagem) 0,5 ml de solução de quitosana liofilizada por 34 dias (20 dias antes e 14 dias após a realização da ferida).

- Quitosana/Piperina (GQP): animais receberam via alimentar (gavagem) 0,5 ml de solução de quitosana/piperina liofilizada por 34 dias (20 dias antes e 14 dias após a realização da ferida).

A Figura 6 apresenta de forma esquemática o delineamento experimental do estudo, mostrando a distribuição dos animais de acordo com os grupos, como também a quantidade de água, solução de quitosana e quitosana-piperina liofilizadas, e ainda, a forma de administração das soluções.

Figura 6 - Esquema do delineamento experimental do estudo



Fonte: Autor

#### 4.4.3 Procedimentos anestésicos

Os animais foram pesados para estabelecer a dose da anestésica, a qual foi realizada por injeção intraperitoneal, com uma associação, na mesma seringa, de cloridrato de ketamina 80 mg/kg e cloridrato de xilazina 5 mg/kg. Em conjunto, essas drogas apresentam um tempo de latência de 2 a 5 minutos e possuem efeito máximo de 30 minutos. Para analgesia dos animais, foi administrada dipirona 25 mg/kg a cada 8 horas durante 5 dias por via intramuscular.

#### 4.4.4 Protocolo de indução da lesão tecidual

Os animais anestesiados foram posicionados em decúbito ventral, sendo em seguida, realizada a tricotomia e assepsia na região dorsal de cada rato. A assepsia foi efetuada com álcool 70%. Após o procedimento, foi realizada a indução de três feridas cutâneas, removendo todas as camadas da pele, com a utilização de *punch* dermatológico de 10 mm, respeitando como limites os ângulos inferiores das escápulas e 1 cm entre as lesões.

#### **4.4.5 Tratamento**

Os ratos dos grupos tratados receberam as soluções de quitosana e quitosana/piperina liofilizada, uma vez ao dia, por meio gavagem, de acordo com os grupos experimentais descritos anteriormente. Para tanto, os animais foram imobilizados manualmente e por meio de uma seringa acoplada a uma agulha de gavagem curva (cânula diâmetro 1,2 mm e comprimento 39 mm), as soluções foram introduzidas no estômago do animal.

#### **4.4.6 Análise macroscópica**

A análise macroscópica da ferida foi realizada diariamente, sendo os parâmetros necrose, inflamação local, odor, presença de fibrose ou líquido na cavidade, julgados como “presentes” ou “ausentes”.

#### **4.4.7 Análise morfométrica do Índice de Reparo das Feridas**

A análise morfométrica foi realizada através de registros fotográficos nos dias 0, 3, 7 e 14. Foi utilizada uma câmera digital no modo básico, sem flash, sem zoom e resolução de 8,0 megapixels. Para a padronização da distância da câmera à ferida utilizou-se um suporte de alumínio distando 20 cm e perpendicular à ferida.

Um paquímetro universal (Tramontina® - PRO-44540004) disposto ao lado dos animais e junto à ferida foi utilizado para a padronização da unidade de área das lesões em mm<sup>2</sup>. As imagens foram analisadas pelo software ImageJ 1,45 (Research Services Branch, Nacional Institutes of Health – NIH (Bethesda, Maryland, EUA). A área residual da lesão foi calculada através da seguinte fórmula: (área inicial - área do dia da medida) / área inicial x 100 = percentual da contração no dia da medida) (AGREN, 1997).

#### **4.4.8 Processamento das amostras**

A coleta das amostras de pele incluiu toda a extensão das feridas, com margem de 1 cm de pele íntegra, sendo realizadas no 3º, 7º e 14º dias.

Ao término do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia por dose excessiva dos anestésicos ketamina (4x 80 mg/kg) e xilazina (4x 10 mg/kg).

#### **4.4.9 Análise histológica**

Após a coleta, as peças permaneceram em soluções de formaldeído a 10% para a fixação durante 24 horas. Posteriormente, foram lavadas em água corrente por 24 horas. Na sequência passaram por desidratação em solução crescente de álcool etílico a 70%, 90% e 100% (1 hora). Após os banhos de desidratação, foi iniciada a diafanização das peças em solução de álcool/xilol (1:1) por 1 hora e, a seguir, em 2 banhos de xilol puro, também por 1 hora cada banho. Logo depois, as peças foram incluídas em parafina e cortadas por meio de um micrótomo rotativo (Spencer® – 820). Foram confeccionadas lâminas histológicas com cortes de 5 µm de espessura. Essas lâminas foram coradas com corante Hematoxilina e Eosina (HE, Merck®) para avaliação do processo de reparação tecidual.

As lâminas foram analisadas qualitativamente em microscópio de luz (Zeiss Axiosop, Carl Zeiss®) com objetiva de 20x. As avaliações foram realizadas e a identificação de cada lâmina foi coberta com uma fita adesiva com o intuito de não haver um conhecimento prévio do avaliador sobre qual grupo será avaliado, evitando assim, qualquer possibilidade de indução nos resultados obtidos. Ao término da análise, a fita foi retirada e o resultado anotado no respectivo grupo.

#### **4.4.10 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas através do teste variância One-Way (ANOVA One-Way) com *pos hoc* de Tukey, para comparar as médias de tempo de reparo tecidual e tamanho da lesão entre os grupos. Para todas as análises, foi considerado nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

#### 5.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho

Espectros na região do infravermelho (FTIR) foram utilizados a fim de caracterizar os grupos químicos de ambos os materiais. Os espectros são mostrados na Figura 7. As bandas vibracionais típicas correspondentes aos grupos químicos formadores 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  $1640\text{ cm}^{-1}$  à banda de vibração relacionada ao grupo amida I (C - O alongamento) da QUI; em  $1550\text{ cm}^{-1}$  à banda de amida II (deformação angular N-H) da QUI; em  $1310\text{ cm}^{-1}$  à banda de amida III (C = O-NH<sub>2</sub> deformação axial) da QUI; e finalmente em  $1060$  e  $1015\text{ cm}^{-1}$  observa-se bandas correspondentes à deformação angular do C-O da QUI (BRUGNEROTTO *et al.*, 2001; PACHECO *et al.*, 2023). As bandas acima mencionadas estão relacionadas na Tabela 1.

Tabela 1- Principais bandas de absorção encontradas no espectro FTIR da Quitosana

Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo
3350	Deformações axiais de O-H e N-H Bandas O-H sobrepostas com N-H
2920	Deformações axiais de C-H
2880	Deformações axiais de C-H
1640	Deformações axiais de C-O e angulares de N-H (Amida I)
1550	Deformações axiais de C-H e angulares de N-H (Amida II)
1310	C = O-NH <sub>2</sub> deformação axial (Amida III)
1060	Deformação angular de C-O
1015	Deformação angular de C-O

Fonte: Autor

Já as bandas vibracionais referentes a PIP são: em  $3371\text{ cm}^{-1}$ , alongando a vibração dos grupos O-H; em  $2945\text{ cm}^{-1}$ , vibração de estiramento assimétrico dos grupos  $\text{CH}_2$ ; em  $2857\text{ cm}^{-1}$ , vibração de estiramento simétrico dos grupos  $\text{CH}_2$ ; em  $1632\text{ cm}^{-1}$ , vibração do estiramento simétrico do grupo  $\text{C}=\text{C}$ ; em  $1579\text{ cm}^{-1}$ , vibração de ligação em aromáticos C-C; em  $1431\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular do grupo  $\text{CH}_2$ ; em  $1248\text{ cm}^{-1}$ , vibração de estiramento assimétrico do grupo  $=\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ; em  $1138\text{ cm}^{-1}$ , vibração de estiramento simétrico do grupo  $=\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ; em  $991\text{ cm}^{-1}$ , vibração de estiramento C-O e em  $849\text{ cm}^{-1}$ , vibração angular do grupo C-H. Todas as bandas foram atribuídas com base na literatura (DAHIYA *et al.*, 2018; ROLAND; BHAWANI, 2016). Abaixo, a Tabela 2 relaciona as principais bandas do espectro FTIR da piperina.

Tabela 2 - Principais bandas de absorção encontradas no espectro FTIR da Piperina

Nº de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo
3371	Deformações axiais de O-H
2945	Vibração de estiramento assimétrico ( $\text{CH}_2$ )
2857	Vibração de estiramento simétrica ( $\text{CH}_2$ )
1632	Vibração do estiramento simétrica (C=C)
1579	Vibração aromática (C-C)
1431	Deformação angular ( $\text{CH}_2$ )
1248	Vibração de estiramento assimétrico ( $=\text{C}-\text{O}-\text{C}$ )
1138	Vibração de estiramento simétrico ( $=\text{C}-\text{O}-\text{C}$ )
991	Vibração de estiramento (C-O)
849	Vibração angular (C-H)

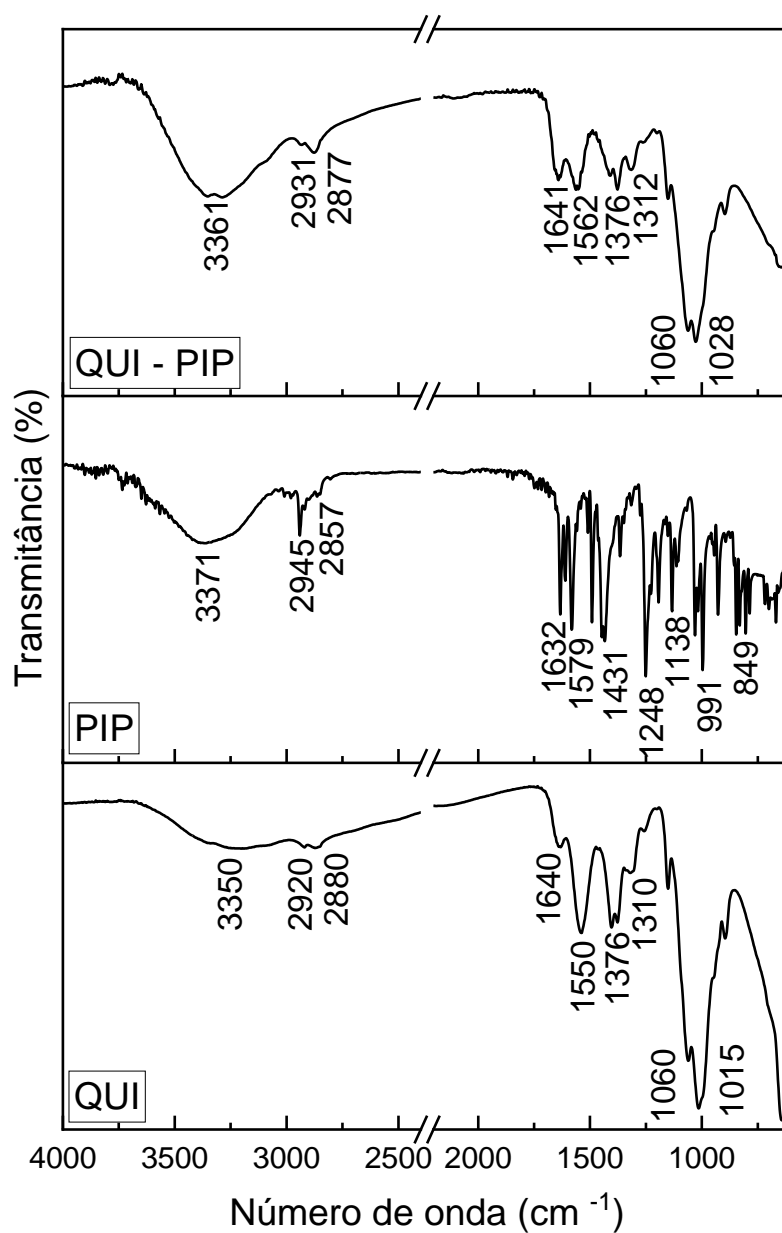
Fonte: Autor

Além dos espectros de QUI e PIP, o espectro da amostra QUI-PIP é apresentado na Figura 7. Conforme podemos observar, o espectro para QUI – PIP tem o perfil semelhante ao espectro da QUI, porém, alguns deslocamentos podem ser vistos se compararmos os dois espectros. Assim, pode se observar deslocamentos para maiores números de onda das bandas atribuídas a deformação de O-H (banda centrada em  $3361\text{ cm}^{-1}$ ), atribuídas as vibrações de



C-H (banda centrada em  $2931\text{ cm}^{-1}$ ), atribuídas as vibrações de amida II (banda centrada em  $1562\text{ cm}^{-1}$ ) e amida III (banda centrada em  $1028\text{ cm}^{-1}$ ). O deslocamento dessas bandas sugere que os grupos químicos relacionados a essas vibrações são os que estão envolvidos em interações intermoleculares (ex: ligação de hidrogênio, forças de Van der Waals, etc) com a molécula de PIP.

Figura 7 - Espectros de FTIR para quitosana, piperina e quitosana-piperina



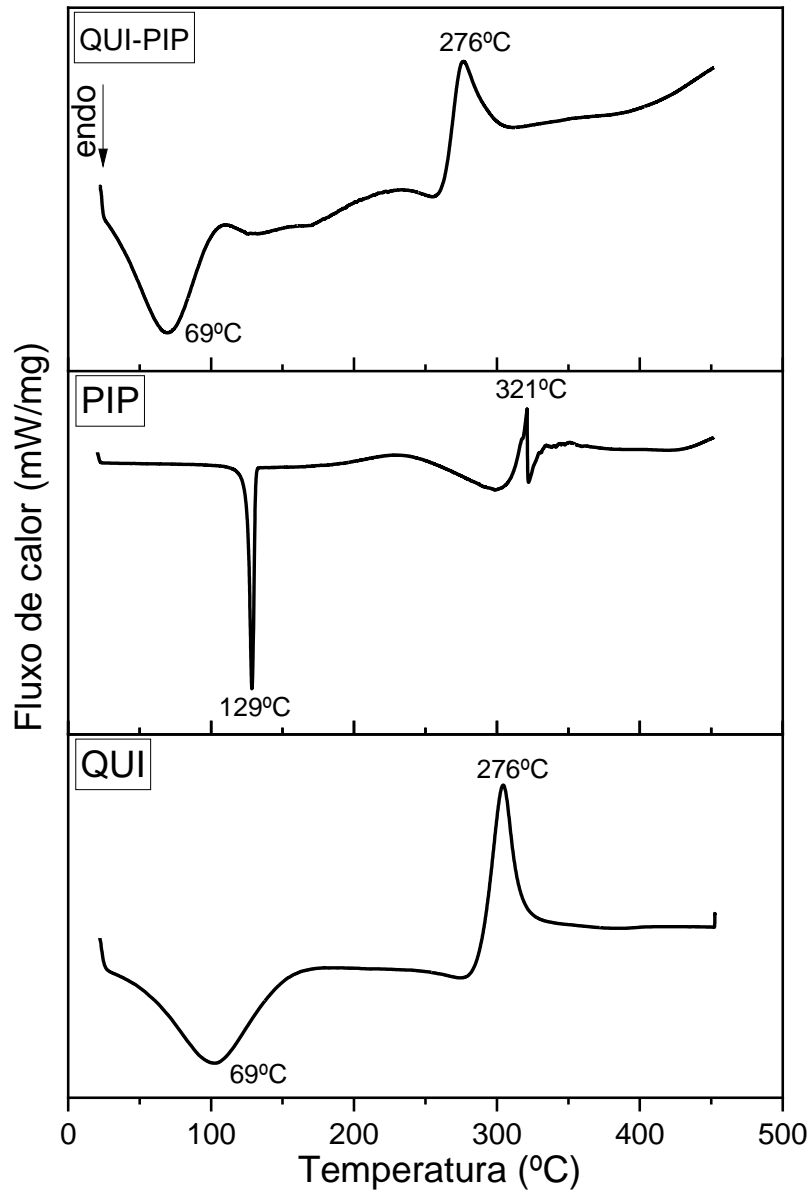
Fonte: Autor

### 5.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

A técnica de Calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma ferramenta analítica eficaz para caracterizar as propriedades térmicas de um material, envolvendo a determinação de curvas de aquecimento e resfriamento com os recursos quantitativos da calorimetria, medindo a temperatura e a energia associada a uma série de eventos térmicos, incluindo fusão, cristalização, transição vítrea e reações de decomposição (TERRA *et al.*, 2022). Esta análise foi empregada a fim de avaliar o comportamento térmico (possível degradação) das amostras, que foram submetidas a temperatura interna do animal (37°C).

A Figura 8 mostra os resultados de DSC. A amostra de PIP exibiu um pico agudo endotérmico, em torno de 129 °C, o qual é referente ao processo de fusão da amostra e um segundo pico exotérmico, em torno de 321°C, o qual é referente a decomposição térmica da amostra. O resultado obtido apresenta-se de acordo com os encontrados na literatura (DAHIYA *et al.*, 2018; SHAKEEL; HAQ; ALSHEHRI, 2020). Já para as amostras de QUI e QUI-PIP, dois picos característicos podem ser observados. O primeiro, pico endotérmico em torno de 69°C, corresponde ao processo de desidratação. O segundo, pico exotérmico em torno de 276°C, corresponde ao processo de decomposição térmica. Os dois processos observados concordam com o que foi observado por Santos *et al.* (SANTOS *et al.*, 2003), que descreveu dois eventos térmicos para amostras de quitosana, sob N<sub>2</sub> em curvas DSC. Através dos resultados é possível afirmar que ambos os materiais não apresentam processo de degradação térmica em temperaturas inferiores a 60°C e estarão ativos quando submetidos a temperatura corporal do animal.

Figura 8 - Termograma obtido por DSC para quitosana, piperina e quitosana-piperina



Fonte: Autor

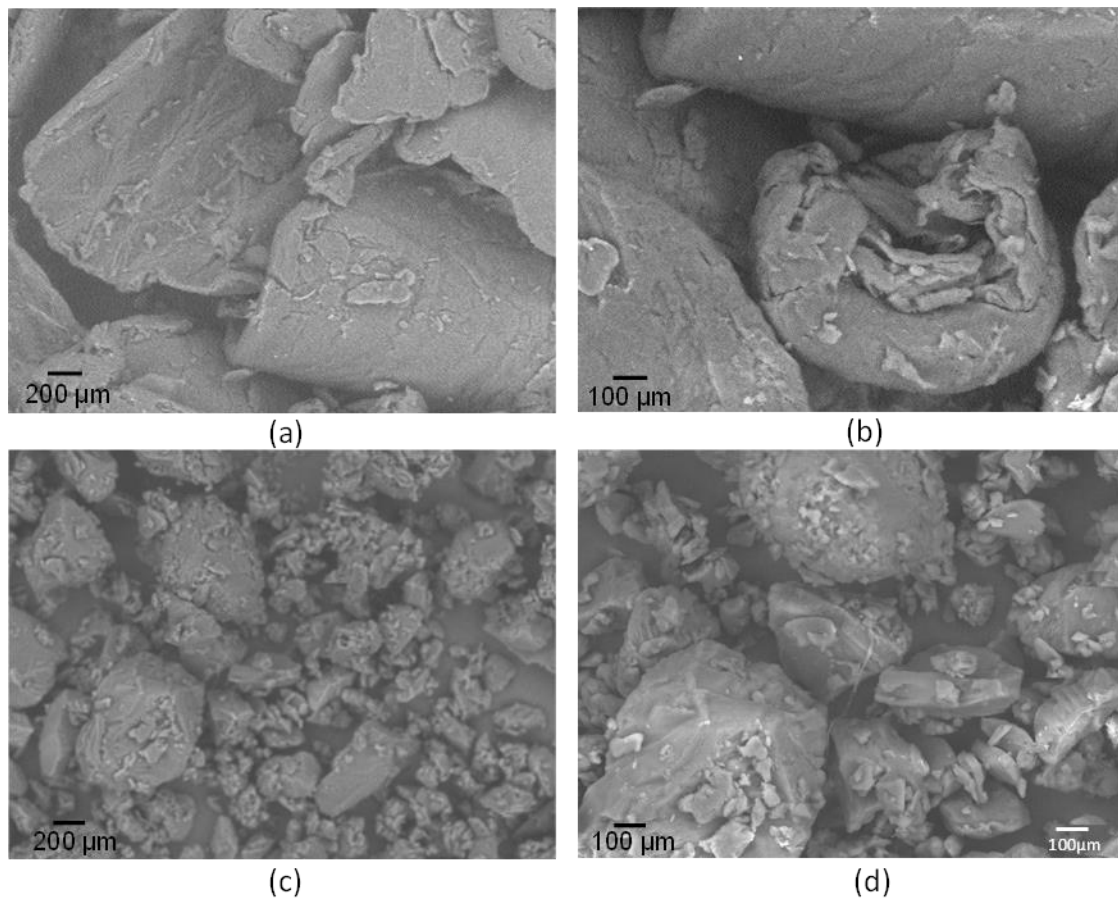
### 5.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) analisa o material através da irradiação por um fino feixe de elétrons que interage com a superfície da amostra e origina uma série de radiações (espalhamento de elétrons) fornecendo, dessa forma, informação morfológica e topográfica da superfície de sólidos (TERRA *et al.*, 2022).

As micrografias obtidas por MEV das amostras de QUI e PIP em pó, são apresentadas na Figura 9. Conforme podemos observar, a superfície das amostras é relativamente rugosa, sendo que para QUI as dimensões das partículas apresentam-se maiores do que para a PIP. Ainda, pode-se perceber que a superfície das partículas de PIP se apresentam mais rugosas ou com maior número de particulados do que a da QUI. As micrografias obtidas por MEV das amostras de QUI e PIP liofilizadas, são apresentadas na Figura 10. Para essas, as imagens apresentam estruturas com formas e superfícies de aspectos bem diferentes do que a observada para as amostras em pó. Nelas é possível perceber que as partículas se encontram mais finas, apresentando área superficial (de contato) maior do que o observado para as amostras em pó (Figura 9). Tal fato se deve ao método de secagem utilizado (liofilização).

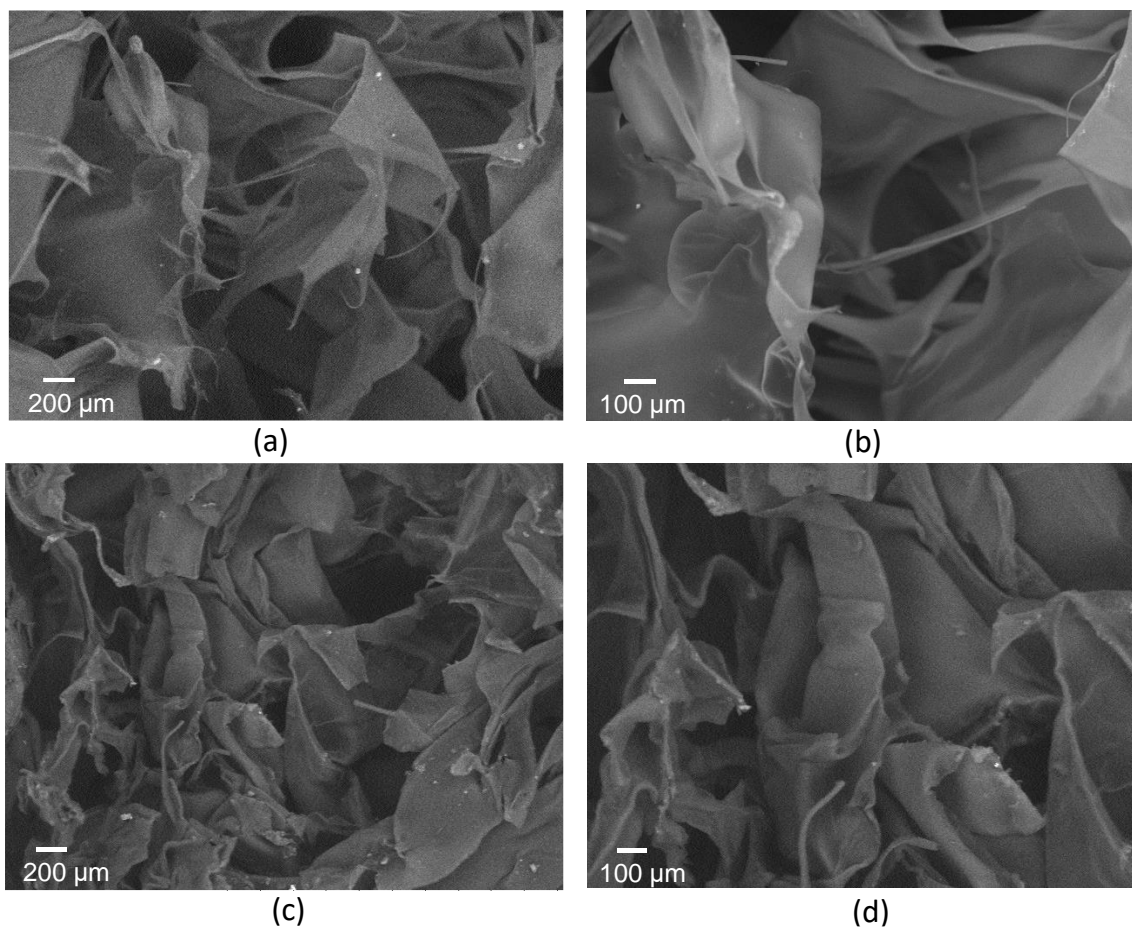
A liofilização (*freeze-drying process*) é o processo de sublimação da água (ou outro solvente), onde a amostra líquida é congelada e o solvente passa do estado sólido para o gasoso, sem passar pelo líquido. Tal processo é muito utilizado na desidratação de alimentos, por exemplo (OYINLOYE; YOON, 2020). Como as moléculas de QUI e PIP estavam solubilizadas antes da secagem por liofilização, suas moléculas se apresentavam em seu máximo estado de linearidade (especialmente no caso de polímeros), e, após secagem, a mesma conformação é mantida na amostra liofilizada. Dessa forma, associado ao aumento da área superficial da amostra (após liofilização), as moléculas tem seus grupos químicos mais acessíveis para, por exemplo, um processo de absorção no trato gastrointestinal dos animais, os quais foram alimentados com as amostras produzidas.

Figura 9 - Micrografias para amostras de quitosana usando magnificação de 500X (a) e 1000X (b) e de piperina usando magnificação de 500X (c) e 1000X (d)



Fonte: Autor

Figura 10 - Micrografias para amostras de quitosana liofilizada usando magnificação de 500X (a) e 1000X (b) e de quitosana-piperina liofilizada usando magnificação de 500X (c) e 1000X (d)



Fonte: Autor

## 5.2 TESTES IN VIVO

### 5.2.1 Peso Corporal dos animais

A tabela 3 resume os resultados da média de peso dos animais, em seus respectivos grupos experimentais, nos dias 0 (indução da ferida) e 14 (antes do procedimento de eutanásia).

Diante dos resultados observou-se uma redução de peso corporal nos animais pertencentes ao GC e um aumento de peso nos animais componentes dos demais grupos experimentais. Em contradição ao encontrado na literatura, que afirma que em virtude da sua característica pungente, a administração oral

da piperina pode ser responsável por desencadear um processo de irritação da mucosa do trato gastrointestinal (SHITYAKOV et al., 2019), o aumento do peso corporal dos animais dos grupos expostos ao alcaloide, pode ser entendido como indicativo de não comprometimento da saúde gástrica por parte do composto.

Tabela 3 – Média de peso (g) dos grupos experimentais no Dia 0 e Dia 14

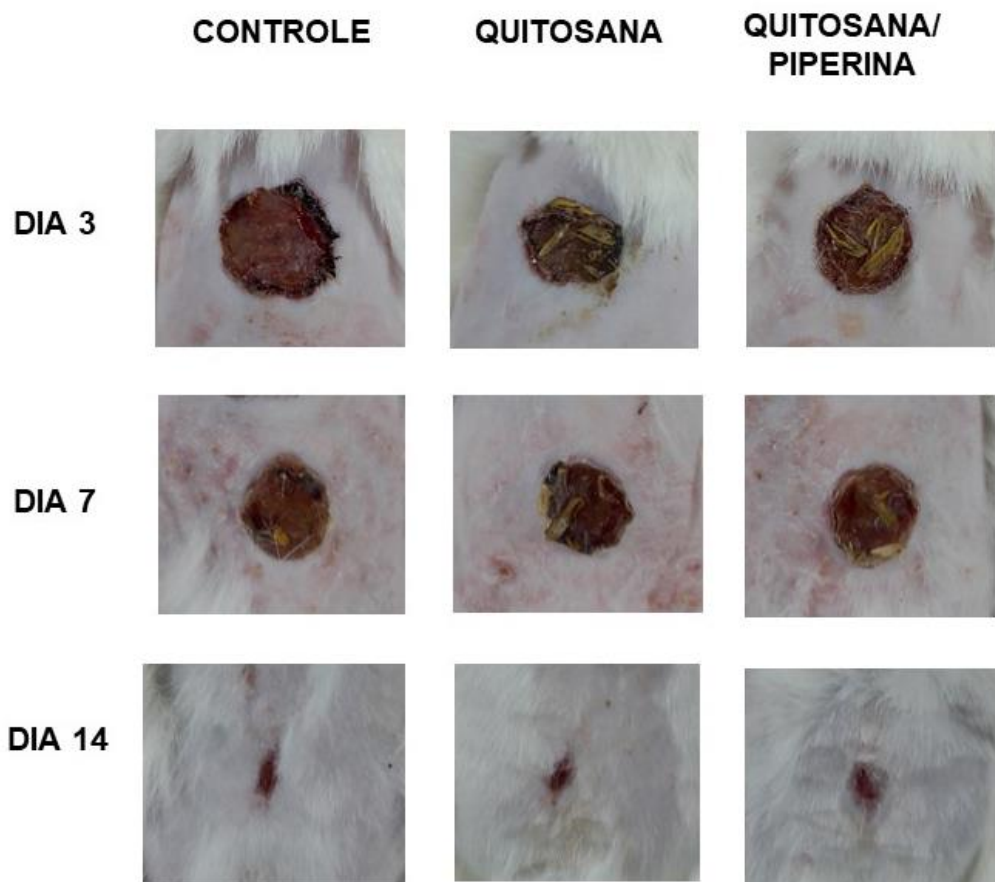
	GC	GQ	GQP
Dia 0	188,4 ± 8,1	152,8 ± 8,2	150,4 ± 2,7
Dia 14	181,8 ± 13,1	185,0 ± 10,1	188,8 ± 8,5

Fonte: Autor

### 5.2.2 Análise Macroscópica

Nos achados macroscópicos obtidos na análise qualitativa dos grupos experimentais, foi possível observar a ausência de necrose, odor, fibrose ou líquido na cavidade da lesão em todos os grupos experimentais (Figura 11).

Figura 11 – Evolução macroscópica das lesões



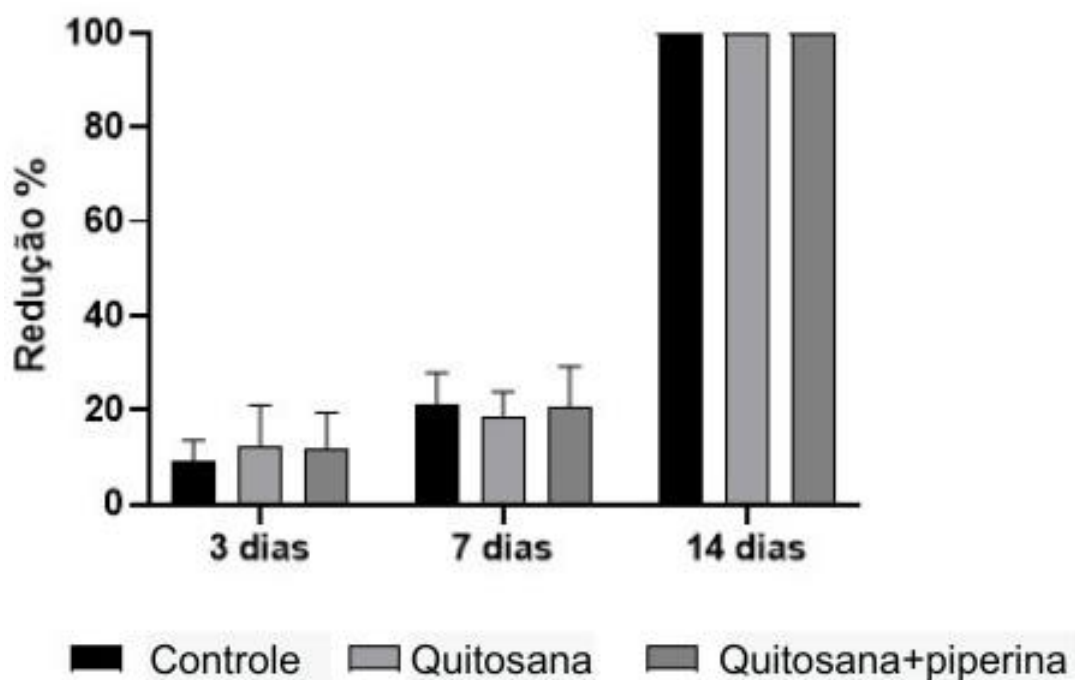
Fonte: Autor

### 5.2.3 Análise Morfométrica

A Figura 12 apresenta o percentual de redução da ferida. De maneira geral, não foi possível observar diferença estatística significativa entre os grupos nos dias 3, 7 e 14. Porém, é possível observar que, no dia 3 os grupos quitosana e quitosana-piperina mostram um pequeno aumento do percentual de redução da área lesionada se comparado ao controle. Entretanto, após 7 dias é verificado que os animais do grupo quitosana mostram um menor percentual de redução da lesão, se comparado aos demais grupos experimentais. Já no dia 14, não foi possível observar diferença na redução da área lesionada entre os grupos.



Figura 12 – Índice de reparo das feridas



Fonte: Autor

#### 5.2.4 Análise histológica descritiva

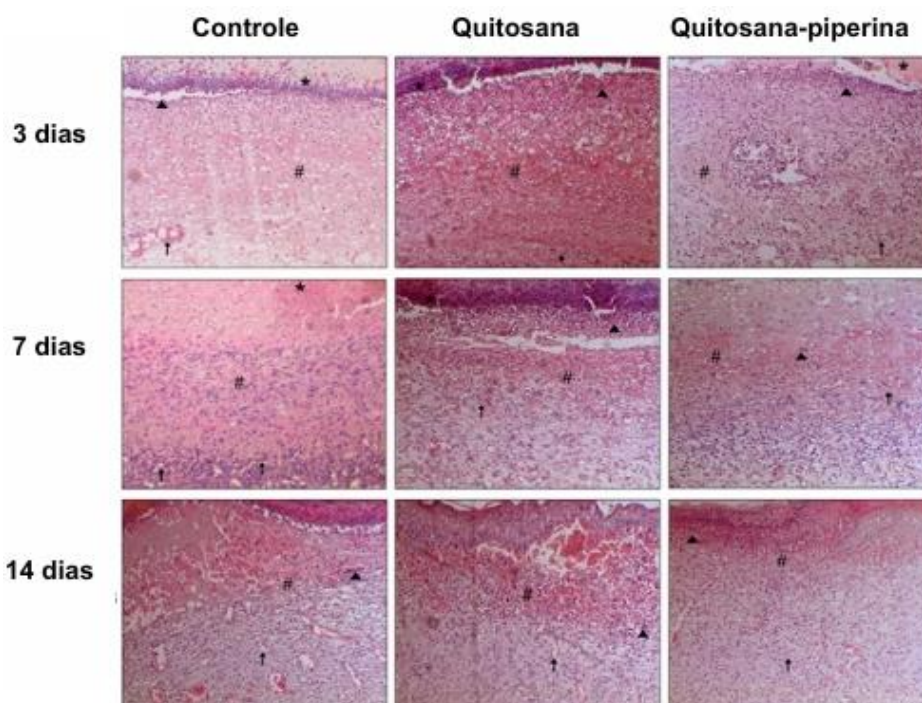
Na análise histológica descritiva (Figura 13), três dias após a indução da lesão, o GC apresentou uma crosta cobrindo toda a superfície da ferida, juntamente com tecido de granulação e a presença de células inflamatórias, mas com poucos fibroblastos e moderada angiogênese. Nos grupos tratados, o processo de reparo foi similar, com a lesão recoberta por uma crosta e um tecido de granulação exibindo um infiltrado inflamatório maior, além de uma maior quantidade de fibroblastos no tecido de granulação e novos vasos sanguíneos comparado ao GC.

Após 7 dias, no grupo GC, ainda foi observada uma crosta cobrindo toda a superfície da lesão, com uma quantidade maior de células inflamatórias no centro da ferida, e uma quantidade discreta a moderada de tecido de granulação e angiogênese. A reepitelização ocorreu apenas de forma discreta nas bordas da lesão. No grupo tratado com quitosana, a lesão também estava coberta por

uma crosta, mas o tecido de granulação ainda apresentou um infiltrado inflamatório, uma quantidade maior de fibroblastos e angiogênese em comparação com o grupo controle, com a reepitelização e deposição de fibras colágenas restrita às bordas da lesão. Da mesma forma, no grupo que recebeu quitosana/piperina, foi observada a presença de uma crosta na região central da lesão, mas com um infiltrado inflamatório leve, uma angiogênese significativa e uma grande quantidade de células fibroblásticas no tecido de granulação, além da formação de fibras de colágeno e epitelização nas margens da lesão.

Após quatorze dias, o GC ainda apresentava a região central sem reepitelização e um tecido de granulação com início de deposição de fibras colágenas. No entanto, o tecido neoformado estava em um estágio de reparo inferior em comparação com os outros grupos. Nos outros dois grupos, GQ e GQP, a principal diferença estava na quantidade e na espessura das fibras colágenas, com o grupo tratado com quitosana/piperina apresentando a maior deposição de fibras colágenas, seguido pelo grupo tratado com quitosana.

Figura 13 - Análise histológica descritiva



Legenda: Fotomicrografias na região central da lesão. \* = crosta; # = tecido de granulação; ▲ = infiltrado inflamatório; ▲ = vasos sanguíneos. Aumento:100 x. Coloração H.E

Fonte: Autor

## 6 CONCLUSÕES

O material obtido no processo de liofilização apresentou rendimento de aproximadamente 88,6%, totalizando 2,4g de QUI e 2,7g de QUI/PIP liofilizadas.

Os espectros FTIR obtidos das amostras apresentaram bandas de vibração típicas dos grupos químicos formadores das moléculas de ambos os materiais trabalhados, estando de acordo com a literatura.

Através das micrografias MEV foi possível identificar os aspectos morfológicos das amostras de QUI, PIP em pó e liofilizada. Nas amostras em pó, as superfícies das amostras se apresentaram relativamente rugosas, sendo observável que a superfície das partículas de PIP se apresentaram mais rugosas ou com maior número de particulados do que a da QUI. Em relação ao tamanho, as partículas de QUI exibiram dimensões maiores do que as de PIP.

Já para as amostras que passaram pelo processo de liofilização (*freeze-drying process*), as micrografias revelaram formas e superfícies com aspectos diferenciados, sendo perceptível que as partículas se encontram mais finas, e conseqüentemente, com uma área superficial (de contato) maior se comparada as amostras em pó.

As análises térmicas obtidas através da técnica de DSC mostram que ambos os materiais não apresentam processo de degradação térmica em temperaturas inferiores a 60°C, sugerindo que estarão ativos (não degradados) quando submetidos a temperatura corporal do animal.

Em relação aos resultados dos testes *in vivo*, a análise qualitativa não revelou sinais de necrose, odor ou líquido na cavidade da lesão, bem como não acusou presença de fibrose.

De maneira geral, ao realizar a análise morfométrica do índice de reparo das feridas, não foi possível observar diferença estatística significativa entre os grupos experimentais nos períodos estudados. Da mesma forma, através da análise histológica do tecido lesionado não foram observadas mudanças significativas entre os grupos experimentais.

A realização de novos estudos é imprescindível para o melhor entendimento dos resultados obtidos, assim como para adequação da metodologia em pontos específicos, tais como: i) aumento do número de animais de seis para oito ratos por grupo; ii) período maior de alimentação prévia dos

animais com as soluções de micropartículas liofilizadas; iii) aumento da frequência de administração das soluções aos animais, de uma para duas vezes ao dia e iv) inclusão de um grupo experimental com uso das micropartículas liofilizadas direto na ferida do animal ou em associação ao uso de membranas a base dos compostos estudados.

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, N.; GOYAL, A.; JAIN, A. Supplements for building a healthy world. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life**, v. 9, p. 01–08, 2020.
- AGREN, M. S. ET AL. A comparative study of three occlusive dressing in the treatment of full-thickness wounds in pigs. **J Am Acad Derm.**, v. 36, p. 53–58, 1997.
- AHMAD, N., FAZAL, H., ABBASI, BH, FAROOQ, S., ALI, M., & KHAN, M. Papel biológico de Piper nigrum L. (pimenta preta): Uma revisão. **Jornal do Pacífico Asiático de Biomedicina Tropical**, v. 2, p. S1945–S1953, 2012.
- ALVEN, S.; ADERIBIGBE, B. A. Chitosan and Cellulose-Based Hydrogels for Wound Management. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 9656, 18 dez. 2020.
- AMIRKIA, V.; HEINRICH, M. Natural products and drug discovery: a survey of stakeholders in industry and academia. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, 26 out. 2015.
- ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research International**, v. 35, n. 2–3, p. 171–176, jan. 2002.
- ARDA, O.; GÖKSÜGÜR, N.; TÜZÜN, Y. Estrutura histológica básica e funções da pele facial. **Clinics in Dermatology**, v. 32, p. 3–13, 2014.
- ASHOKKUMAR, K. et al. Phytochemistry and therapeutic potential of black pepper [Piper nigrum (L.)] essential oil and piperine: a review. **Clinical Phytoscience**, v. 7, n. 1, p. 52, 9 dez. 2021.
- ATAL, C. K.; ZUTSHI, U.; RAO, P. G. Scientific evidence on the role of Ayurvedic herbals on bioavailability of drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 4, n. 2, p. 229–232, set. 1981.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, dez. 2015.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 27–34, 2007.
- BANO, G. et al. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, n. 6, p. 615–617, dez. 1991.
- BÁRBARA FLORES FERREIRA SILVA RODRIGUES. **Engenharia de tecidos para regeneração da pele: retrospectiva e perspectivas futuras**. [s.l.] Universidade Fernando Pessoa, 2012.
- BARRETT, K. E. **Fisiologia Gastrointestinal**. 2. ed. Porto Alegre: [s.n.].
- BATISTA, L. L. V. et al. Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, n. 6, p. 515–520, dez. 2012.
- BONTEMPO, M. **Pimenta e seus benefícios à saúde**. 1. ed. [s.l.] Editora Alaúde, 2007.
- BRUGNEROTTO, J. et al. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569–3580, 2001.

- CARDOSO, J. F. R. ET AL. Avaliação do efeito tóxico da Piperina isolada da pimenta do reino (*Piper nigrum* L) em camundongos. **Revista Universidade Rural: Série Ciências da Vida**, p. 85–91, jan. 2005.
- CARDOSO, L. et al. Implante de membranas de PLLA/trietil-citrato como alternativa no tratamento de feridas cutâneas. **Polimeros**, v. 23, n. 6, p. 798–806, 2013.
- CARNEVALLIA, D. B.; ARAÚJO, A. P. S. Biological Activity of Black Pepper (*Piper nigrum* L.): Literature Review. **Uniciências**, v. 17, p. 41–46, dez. 2013a.
- CARNEVALLIA, D. B.; ARAÚJO, A. P. S. Atividade Biológica da Pimenta Preta (*Piper nigrum* L.): Revisão de Literatura. **Uniciência**, v. 17, p. 41–46, dez. 2013b.
- 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, 3 ago. 2021.
- CHAVES, M. E. DE A. et al. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. **An Bras Dermatol.**, v. 89, n. 4, p. 616–623, 2014.
- CHEUNG, R. et al. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p. 5156–5186, 14 ago. 2015.
- CLARK, R. A. F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M. G. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 1018–1029, maio 2007.
- COSTA, N.M. B. COSTA, ROSA, C. O. . **Alimentos Funcionais: Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.
- COSTA, J. G. ET AL. Composição Química e Toxicidade de Óleos Essenciais de Espécies de Piper Frente a Larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 29, p. 463–7, 2010.
- CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T.; ENGLYST, H. N. Prebiotic digestion and fermentation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 415s-420s, fev. 2001.
- DAHIYA, S. et al. Conjugation of epigallocatechin gallate and piperine into a zein nanocarrier: Implication on antioxidant and anticancer potential. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, n. 3, 2018.
- DAMIAN, C. et al. Quitosana: Um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alim. Nutr., Araraquara**, v. 16, n. 2, p. 195–205, 2005.
- DANG, Q. et al. Preparation, characterization, and evaluation of 3,6-O-N-acetylenediamine modified chitosan as potential antimicrobial wound dressing material. **Carbohydrate Polymers**, v. 180, p. 1–12, jan. 2018.
- DEROSA, G.; MAFFIOLI, P.; SAHEBKAR, A. Piperine and Its Role in Chronic Diseases. In: SPRINGER, C. (Ed.). **Avanços em Medicina e Biologia Experimental**. [s.l: s.n.]. p. 173–184.
- DHIVYA, V. et al. Piperine modulates isoproterenol induced myocardial ischemia through antioxidant and anti-dyslipidemic effect in male Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 705–713, mar. 2017.
- DOGRA, R. K. S.; KHANNA, S.; SHANKER, R. Immunotoxicological effects of piperine in mice. **Toxicology**, v. 196, n. 3, p. 229–236, 15 mar. 2004.
- DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; SANTINI, A. Nutraceuticals in Human

Health. **Foods**, v. 9, n. 3, p. 370, 23 mar. 2020.

EE, G. C. L. et al. Pellitorine, a Potential Anti-Cancer Lead Compound against HL60 and MCT-7 Cell Lines and Microbial Transformation of Piperine from Piper Nigrum. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2398–2404, 5 abr. 2010.

ELKADY, A. A.; TAWFIK, S. S. Anti-inflammatory role of piperine against rat lung tissue damage induced by gamma-rays. **International Journal of Radiation Research**, v. 16, n. 1, p. 75–84, 1 jan. 2018.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. São Paulo: [s.n.].

FERNANDO, L. A. T. et al. Chitin Extraction and Synthesis of Chitin-Based Polymer Films from Philippine Blue Swimming Crab (*Portunus pelagicus*) Shells. **Procedia Chemistry**, v. 19, p. 462–468, 2016.

FERREIRA, T. C. DOS R. et al. Caracterização da pele facial dos acadêmicos de Fisioterapia do Centro Universitário do Pará. **Centro de Pesquisas Avançadas em Qualidade de Vida**, n. V13N2, p. 1, 2021.

FERREIRA, W. S. et al. Piperine, its Analogues and Derivatives: Potencial as Antiparasitic Drugs. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, 2012.

FOLLMANN, H. D. M. et al. Advanced fibroblast proliferation inhibition for biocompatible coating by electrostatic layer-by-layer assemblies of heparin and chitosan derivatives. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 474, p. 9–17, jul. 2016.

FRANÇA, A. A. C. et al. Piperine's potentials: A study carried out by means of scientific and technological prospection techniques. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 2, p. 310–322, 2021.

FU, J.; YANG, F.; GUO, Z. The chitosan hydrogels: from structure to function. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 21, p. 17162–17180, 2018.

GAO, X. et al. Transformation of Chitin and Waste Shrimp Shells into Acetic Acid and Pyrrole. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 7, p. 3912–3920, 5 jul. 2016.

GAUGLITZ, G. G. et al. Hypertrophic Scarring and Keloids: Pathomechanisms and Current and Emerging Treatment Strategies. **Molecular Medicine**, v. 17, n. 1–2, p. 113–125, 5 jan. 2011.

GIOTTI SALVADOR, M. M.; CECHINEL-ZANCHETT, C. C. Nutricosméticos em desordens estéticas: foco na acne e envelhecimento cutâneo. **Archives of Health Investigation**, v. 8, n. 12, p. 853–860, 2020.

GIROTTI, C. et al. Effect of chitosan consumption in lipidic parameters, glycemics and intestinal microflora in rats Wistar. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 2, p. 170–175, 2017.

GRAY H, ET AL. **Gray's Anatomy - The Anatomical Basis of Clinical Practice**. 40. ed. Nova Iorque: [s.n.].

H. ROLIM, A. E. et al. Chitosan Scaffolds - Physico-Chemical and Biological Properties for Bone Repair. **Revista Virtual de Química**, p. 211–228, 2018.

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, fev. 2016.

HAQ, I. et al. Piperine: A review of its biological effects. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 2, p. 680–700, 14 fev. 2021a.

HAQ, I. U. et al. Piperine: A review of its biological effects. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 2, p. 680–700, 2021b.

- HASSAINIA, A.; SATHA, H.; BOUFI, S. Chitin from *Agaricus bisporus*: Extraction and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 1334–1342, 2018.
- 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.
- HU, S. et al. Preparation of composite hydroxybutyl chitosan sponge and its role in promoting wound healing. **Carbohydrate Polymers**, v. 184, p. 154–163, mar. 2018.
- ISAAC C, LADEIRA PRS, REGO FMP, ALDUNATE JCB, F. M. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Rev.Med.**, p. 125–31, 2010.
- ISAAC, C. et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 3/4, p. 125, 2010.
- JAUDSZUS, A. et al. Evaluation of suppressive and pro-resolving effects of EPA and DHA in human primary monocytes and T-helper cells. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 4, p. 923–935, 2013.
- JOHNER, K.; NETO, C. F. G. Analysis of risk factors for skin aging: nutritional aspects. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 3, p. 10000–10018, 7 maio 2021.
- JÚNIOR, J. DA S. S. **Síntese, caracterização, cálculos de DFT e atividade antifúngica de novos derivandos da piperina**. [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, 2021.
- KALAISELVIMARY, J.; RAMESH PRABHU, M. Fabrications and investigation of physicochemical and electrochemical properties of heteropoly acid-doped sulfonated chitosan-based polymer electrolyte membranes for fuel cell applications. **Polymer Bulletin**, v. 76, n. 3, p. 1401–1422, 23 mar. 2019.
- KHAN, S. et al. Development of RAPD markers for authentication of *Piper nigrum* (L.). **Environ We Int J Sci Tech**, p. 47–56, 2010.
- LI, H. et al. Crocodile Oil Enhances Cutaneous Burn Wound Healing and Reduces Scar Formation in Rats. **Academic Emergency Medicine**, v. 19, n. 3, p. 265–273, 21 mar. 2012.
- LOPES, C. et al. Chitin production from crustacean biomass: Sustainability assessment of chemical and enzymatic processes. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 4140–4151, jan. 2018.
- MACHADO, G.; FURINI PUTON, B.; DALLAZEM BERTOL, C. Nutracêuticos: Aspectos Legais E Científicos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 16, p. 1–9, 2019.
- MAEDA, A. et al. Piperine Promotes Glucose Uptake through ROS-Dependent Activation of the CAMKK/AMPK Signaling Pathway in Skeletal Muscle. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 11, p. 1800086, jun. 2018.
- MAO, X. et al. Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 143, p. 814–823, fev. 2017.
- MATICA 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, 24 nov. 2019.
- MIRANDA, L. Importância da nutrição na cicatrização de feridas: uma scoping review. **Revista Feridas**, v. 11, n. 61, p. 2248–2252, 13 dez. 2023.
- MOEINI, A. et al. Wound healing and antimicrobial effect of active



secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review.

**Carbohydrate Polymers**, v. 233, p. 115839, 1 abr. 2020.

MUÑOZ, G. et al. Extraction of chitosan from *Aspergillus niger* mycelium and synthesis of hydrogels for controlled release of betahistine. **Reactive and Functional Polymers**, v. 91–92, p. 1–10, jun. 2015.

NAYARA SZWED, D.; LUCIA PEREIRA DOS SANTOS, V. Growth Factors Involved In Skin Healing. **Cad. da Esc. de Saúde**, v. 1, n. 15, p. 7–17, 2015.

NOTODIHARDJO, S. C. et al. A comparison of the wound healing process after the application of three dermal substitutes with or without basic fibroblast growth factor impregnation in diabetic mice. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 73, n. 8, p. 1547–1555, ago. 2020.

OLIVEIRA, I.V.P.M.; DIAS, R. V. C. Wound healing: stages and influencing factors. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, p. 267–271, 2012.

OLIVEIRA, F. P. DE et al. Classificações de intervenções e resultados de enfermagem em pacientes com feridas: mapeamento cruzado. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 37, n. 2, 2016.

OU, Q. et al. More natural more better: triple natural anti-oxidant puerarin/ferulic acid/polydopamine incorporated hydrogel for wound healing. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 237, 11 dez. 2021.

OYINLOYE, T. M.; YOON, W. B. Effect of freeze-drying on quality and grinding process of food produce: A review. **Processes**, v. 8, n. 3, p. 1–23, 2020.

PACHECO, K. M. L. et al. Chitosan and chitosan/turmeric-based membranes for wound healing: Production, characterization and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, p. 127425, dez. 2023.

PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Studies on the influence of dietary spices on food transit time in experimental rats. **Nutrition Research**, v. 21, n. 9, p. 1309–1314, set. 2001.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO. **Manual de Padronização de Curativos**. São Paulo, 2021. Disponível em: <<http://fi-admin.bvsalud.org/document/view/pn5m4>>

PURI, V. et al. A Comprehensive Review on Nutraceuticals: Therapy Support and Formulation Challenges. **Nutrients**, v. 14, n. 21, p. 4637, 3 nov. 2022.

RAVI KUMAR, M. N. . A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, nov. 2000.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.

REN, C.; LIANG, Z. RETRACTED: Piperine alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory injury by down-regulating microRNA-127 in murine chondrogenic ATDC5 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 947–954, jul. 2018.

RIZEQ, B. R. et al. Synthesis, Bioapplications, and Toxicity Evaluation of Chitosan-Based Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5776, 16 nov. 2019.

RODGERS, G. et al. Piperine impairs the migration and T cell-activating function of dendritic cells. **Toxicology Letters**, v. 242, p. 23–33, fev. 2016.

ROGER, J. D. P. **Plantas mágicas: enciclopédia de plantas**

**medicinais.** São Paulo: , 1998. (Nota técnica).

ROLAND, R. M.; BHAWANI, S. A. Synthesis and Characterization of Molecular Imprinting Polymer Microspheres of Piperine: Extraction of Piperine from Spiked Urine. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, 2016.

ROSIŃCZUK, J. et al. Mechanoregulation of Wound Healing and Skin Homeostasis. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–13, 2016.

SACHDEVA, V.; ROY, A.; BHARADVAJA, N. Current Prospects of Nutraceuticals: A Review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 884–896, 7 set. 2020.

SAHU, P.; CHOURASIYA, A.; GAJBHIYE, V. Higher Therapeutic Benefits of piperine Loaded Optimized Chitosan Microspheres for Improved Hepatoprotective Potentials. **Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 39–44, 2012.

SALARI, M. et al. Use of gamma irradiation technology for modification of bacterial cellulose nanocrystals/chitosan nanocomposite film. **Carbohydrate Polymers**, v. 253, p. 117144, fev. 2021.

SÁNCHEZ-MACHADO, D. I. et al. The use of chitosan as a skin-regeneration agent in burns injuries: A review. **e-Polymers**, v. 22, n. 1, p. 75–86, 4 jan. 2022.

SANTOS, J. E. DOS et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, v. 13, n. 4, p. 242–249, 2003.

SELVENDIRAN, K.; BANU, S. M.; SAKTHISEKARAN, D. Protective effect of piperine on benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Clinica Chimica Acta**, v. 350, n. 1–2, p. 73–78, dez. 2004.

SHAKEEL, F.; HAQ, N.; ALSHEHRI, S. Solubility Data of the Bioactive Compound Piperine in (Transcutol + Water) Mixtures: Computational Modeling, Hansen Solubility Parameters and Mixing Thermodynamic Parameters. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2743, 13 jun. 2020.

SHITYAKOV, S. et al. Phytochemical and pharmacological attributes of piperine: A bioactive ingredient of black pepper. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 176, p. 149–161, 2019.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrosolúveis, Aplicações Farmaceuticas, e Avanços. **Quim. Nova**, v. 29, p. 776–785, 2006.

SILVA NETA, M. N. ET AL. **Avaliação antifúngica da piperina contra as cepas de Candida.** In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA E ENSINO EM CIÊNCIAS. **Anais...**Campina Grande: 2019.

SMILKOV, K. et al. Piperine: Old Spice and New Nutraceutical? **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 15, p. 1729–1739, 19 ago. 2019.

SOARES, R. D. F. et al. Development of a chitosan hydrogel containing flavonoids extracted from *Passiflora edulis* leaves and the evaluation of its antioxidant and wound healing properties for the treatment of skin lesions in diabetic mice. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 108, n. 3, p. 654–662, 4 mar. 2020.

SORG, H. et al. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surgical Research**, v. 58, n. 1–2, p. 81–94, 2017.

SOUZA, P. G. DE; CASTRO, M. S. DE; SILVA, L. P. DA. The biology of fibroblastic proliferation: excessive extracellular collagen deposition during skin injury repair. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 28989–29010,

2021.

SRINIVASAN, K. Black Pepper and its Pungent Principle-Piperine: A Review of Diverse Physiological Effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 8, p. 735–748, 25 out. 2007.

SURESH, D. V. et al. Binding of bioactive phytochemical piperine with human serum albumin: A spectrofluorometric study. **Biopolymers**, v. 86, n. 4, p. 265–275, 3 jul. 2007.

TERRA, I. A. A. et al. Técnicas de Caracterização de Polímeros. In: BLUCHER (Ed.). **Nanotecnologia Aplicada a Polímeros**. São Paulo: Editora Blucher, 2022. p. 497–590.

THIRUMALAI, T.; TAMILSELVAN, N.; DAVID, E. Hypolipidemic activity of Piper betel in high fat diet induced hyperlipidemic rat. **Journal of Acute Disease**, v. 3, n. 2, p. 131–135, 2014.

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, mar. 2000.

TUNGLAND, B. C.; MEYER, D. Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): Their physiology and role in human health and food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, n. 3, p. 90–109, 2002.

UL-ISLAM, M. et al. **Chitosan-based nanostructured biomaterials: Synthesis, properties, and biomedical applications**. **Advanced Industrial and Engineering Polymer Research** KeAi Communications Co., , 2023.

UMAR, A. K. et al. Film-Forming Spray of Water-Soluble Chitosan Containing Liposome-Coated Human Epidermal Growth Factor for Wound Healing. **Molecules**, v. 26, n. 17, p. 5326, 2 set. 2021.

VANDEVORD, P. J. et al. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 59, n. 3, p. 585–590, 5 mar. 2002.

VÁZQUEZ, J. et al. Production of Chitin from *Penaeus vannamei* By-Products to Pilot Plant Scale Using a Combination of Enzymatic and Chemical Processes and Subsequent Optimization of the Chemical Production of Chitosan by Response Surface Methodology. **Marine Drugs**, v. 15, n. 6, p. 180, 16 jun. 2017.

VIVCHARENKO, V. et al. Elastic and biodegradable chitosan/agarose film revealing slightly acidic pH for potential applications in regenerative medicine as artificial skin graft. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 172–183, dez. 2020.

WANG-SHENG, C. et al. Piperine attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 42, p. 44–48, jan. 2017.

XIA, Y. et al. Applications of Chitosan and its Derivatives in Skin and Soft Tissue Diseases. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2 maio 2022.

XU, Y. et al. Transformation of the matrix structure of shrimp shells during bacterial deproteinization and demineralization. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 90, 5 dez. 2013.

YING, X. et al. Piperine inhibits IL- $\beta$  induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocyte. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 293–299, out. 2013.

ZHANG, E. et al. Advances in chitosan-based nanoparticles for oncotherapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, p. 115004, out. 2019.

ZHANG, K. et al. Hydroxybutyl chitosan/diatom-biosilica composite sponge for hemorrhage control. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, p. 116051, maio 2020.

## ANEXO A



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ - UESPI  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE CÁPSULAS DE QUITOSANA E PIPERINA PARA REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS**”. Protocolo número 023005/2022-00, sob responsabilidade de *Antônio Luiz Martins Maia Filho*, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei número 11.794 de 08 de outubro de 2008, Decreto número 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **DEFERIDO AD REFERENDUM**, pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí.

ESPÉCIE	LINHAGEM	SEXO	IDADE	PESO	VIGÊNCIA DO PROJETO	Nº DE ANIMAIS
RATO HETEROGÊNICO	WISTAR	MACHO	2 MESES	250G	01 ANO E 06 MESES	72

TERESINA, 29 DE NOVEMBRO DE 2022

Prof. Dr. Francisco Araújo

CRMV – 0415/17

Coordenador do CEUA-UESPI

Portaria nº 0667 de 11/11/21