

UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA CAMPUS
ITAQUERA – SÃO PAULO

KAROLINE MARIA LOPES PACHECO

**PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE MEMBRANAS À BASE DE
QUITOSANA E CÚRCUMA NO PROCESSO DE REPARAÇÃO
TECIDUAL**

**PRODUCTION AND USE OF MEMBRANES BASED ON CHITOSAN
AND TURMERIC IN THE TISSUE REPAIR PROCESS**

São Paulo – SP
2022

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
BIOMÉDICA CAMPUS ITAQUERA – SÃO PAULO**

KAROLINE MARIA LOPES PACHECO

**PRODUCTION AND USE OF MEMBRANES BASED ON CHITOSAN
AND TURMERIC IN THE TISSUE REPAIR PROCESS**

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

Profa. Dra. Adriana Pavinatto da Costa
Orientadora

Profa. Dra. Carla Roberta Tim
Coorientadora

São Paulo – SP
2022

DEDICATÓRIA

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

P12p

PACHECO, Karoline Maria Lopes.

Produção e utilização de membranas à base de quitosana e cúrcuma no processo de reparação tecidual / Karoline Maria Lopes Pacheco. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2022.

64 f.: il. color.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Profa. Dra. Adriana Pavinato da Costa.

1. Reparação tecidual. 2. Biomateriais. 3. Quitosana. 4. Cúrcuma. I. Costa, Adriana Pavinato da. II. Título.

CDD 620.82



TERMO DE APROVAÇÃO

KAROLINE MARIA LOPES PACHECO

**“PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE MEMBRANAS À BASE DE QUITOSANA E CÚRCUMA
NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL”**

Dissertação aprovada oficialmente pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Adriana Pavinatto da Costa

Prof.(a) Dr.(a) Adriana Pavinatto da Costa (presidente-orientadora)

Livia Assis Garcia

Prof.(a) Dr.(a) Livia Assis Garcia (UNIVERSIDADE BRASIL)

Maldina Cerqueira Silva

Prof.(a) Dr.(a) Maldina Cerqueira Silva (UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS)

São Paulo, 23 de setembro de 2022

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

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



Termo de Autorização

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

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

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

Título do Trabalho: **“PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE MEMBRANAS À BASE DE QUITOSANA E CÚRCUMA NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL”**

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

Autor(es):

Discente: **Karoline Maria Lopes Pacheco**

Assinatura: Karoline Maria Lopes Pacheco

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

Assinatura: Adriana Pavinatto da Costa

Coorientador(a):

Assinatura: _____

Data: 23/09/2022

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Evilasio e Remédios, que sempre me ensinaram que conhecimento é a minha riqueza, o meu marido que sempre me apoia e me incentiva a continuar, mesmo diante das dificuldades e a minha filha, minha pituquinha. Dedico a vocês mais essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por ser meu guia e iluminar meus passos.

Aos meus pais Evilásio e Remédios por serem responsáveis pela minha formação acadêmica e pela minha formação como mulher, agradeço também pelo amor e carinho incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao meu Esposo, Augusto, que me incentivou a iniciar e a não desistir frente as dificuldades nestes dois anos, obrigada por me incentivar a não desistir dos meus sonhos e me mostrar que sou capaz.

A minha princesa Isabela, que é a luz da minha vida, aquela que sempre me traz paz e força pra nunca desistir, essa conquista ficou ainda maior com a sua chegada.

A Universidade Brasil pela oportunidade de me especializar e por ter colocado pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta, como a minha professora e orientadora Dr. Adriana Pavinatto, assim como a professora Dra. Carla Tim, pela paciência, ajuda e confiança depositada em mim, pela autonomia e ensinamentos, que foram de total importância para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Dr. Antonio Luiz Maia, colaborador desse trabalho, e a toda equipe do Biotério da UESPI, pela ajuda técnica e científica nessa pesquisa, sem essa parceria não conseguiríamos chegar aos excelentes resultados.

Agradeço também a CAPES pelo apoio financeiro!!

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

Muito obrigada a todos!!!!

RESUMO

A reparação tecidual é um processo fisiopatológico complexo e dinâmico que envolve fases distintas que se sobrepõem. Nesse contexto, biopolímeros e extratos naturais vem sendo muito utilizados no desenvolvimento de novos materiais que favoreçam o processo de reparação. A quitosana e a cúrcuma surgem como uma interessante alternativa, por possuírem propriedades reparadoras e antimicrobianas, respectivamente. No presente trabalho, foram produzidas, caracterizadas e utilizadas em experimentos *in vivo* membranas à base de quitosana e cúrcuma com potencial aplicação para reparo de pele. As membranas foram produzidas através da técnica casting (evaporação do solvente) de formação de filmes, sendo produzidas membranas de quitosana 1% (m/v), quitosana mista com glicerol 30% (m/m em relação a massa da quitosana) e quitosana mista com glicerol 30% + cúrcuma 1,5 % (m/m em relação a massa da quitosana). As caracterizações das propriedades físico-químicas e mecânicas das membranas foram feitas através de medidas de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), ângulo de contato, medidas de espessura e ensaios mecânicos. Foram obtidas membranas sustentáveis, homogêneas e flexíveis de todos os materiais testados. Os espectros FTIR mostram as principais bandas vibracionais para grupos químicos de quitosana e glicerol, não sendo vista nenhuma banda referente a cúrcuma. Ensaios mecânicos mostraram que as membranas que contém glicerol são mais flexíveis do que as formadas com quitosana pura. As membranas formadas com glicerol e glicerol + cúrcuma são mais hidrofílicas em comparação com a membrana formada por quitosana pura. Os resultados dos experimentos *in vivo* mostram que o grupo que recebeu a membrana de quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5% apresentou redução estatisticamente maior da área lesionada, bem como melhores resultados na análise histológica, em comparação aos outros grupos experimentais. O material aqui desenvolvido, proveniente de fonte natural, de baixo custo e fácil aplicação, capaz de acelerar o processo de reparação de lesões na pele, configura contribuição na literatura atual.

Palavras-chave: reparação tecidual; biomateriais; quitosana; cúrcuma.

ABSTRACT

Tissue repair is a complex and dynamic pathophysiological process that involves distinct overlapping phases. In this context, biopolymers and natural extracts have been widely used in the development of new materials that favor the repair process. Chitosan and turmeric appear as an interesting alternative, as they have repair and antimicrobial properties, respectively. In the present work, membranes based on chitosan and turmeric were produced, characterized, and used for in vivo experiments with potential application for skin repair. The membranes were produced through the casting technique (evaporation of the solvent) of film formation, being produced membranes of chitosan 1% (m/v), chitosan mixed with glycerol 30% (m/m in relation to the mass of chitosan) and chitosan mixed with 30% glycerol + 1.5% turmeric (m/m in relation to chitosan mass). The characterizations of the physicochemical and mechanical properties of the membranes were made through measurements of absorption spectroscopy in the infrared region (FTIR), contact angle, thickness measurements and mechanical tests. Sustainable, homogeneous, and flexible membranes were obtained from all materials tested. The FTIR spectra show the main vibrational bands for chitosan and glycerol chemical groups, no band referring to turmeric was seen. Mechanical tests have shown that membranes containing glycerol are more flexible than those formed with pure chitosan. Membranes formed with glycerol and glycerol + turmeric are more hydrophilic compared to the membrane formed by pure chitosan. The results of the in vivo experiments show that the group that received the membrane of chitosan/glycerol 30%/turmeric 1.5% showed a statistically greater reduction in the injured area, as well as better results in the histological analysis, compared to the other experimental groups. The material developed here, from a natural source, low cost and easy to apply, capable of accelerating the process of repairing skin lesions, constitutes a contribution in the current literature.

Keywords: tissue repair; biomaterials; chitosan; turmeric.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

No presente trabalho foram produzidas e caracterizadas membranas que visam a utilização como agente cicatrizante. A produção desse material teve como base o polissacarídeo quitosana e a cúrcuma, utilizando glicerol como plastificante na formação de membranas. A quitosana foi escolhida principalmente devido as suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade, assim como suas ações anti-microbiana e reparadora. Já a cúrcuma foi escolhida por apresentar efeitos anti-inflamatórios significativos, podendo regular os níveis de autofagia em vários tipos de células. Os resultados dessa pesquisa mostraram a formação de membranas sustentáveis, homogêneas e flexíveis. O uso do glicerol melhorou as propriedades mecânicas das membranas (tornando-as mais flexíveis) e, a adição do glicerol e da cúrcuma tornaram a membrana de quitosana mais hidrofílica, sugerindo maior adesão as feridas (ambiente úmido). As membranas aqui produzidas foram testadas em experimentos *in vivo* para reparação de feridas de animais (ratos). Os resultados mostraram que as membranas formadas por quitosana e cúrcuma aceleram o fechamento das feridas, diminuindo os fatores inflamatórios e aumentando os responsáveis pela cicatrização, induzindo a reparação tecidual das lesões.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas do reparo tecidual.....	20
Figura 2. Membranas formadas por a) quitosana, b) quitosana/glicerol 30%, c) quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5%, secas em temperatura ambiente, com fluxo de ar	35
Figura 3. Membranas formadas por a) quitosana, b) quitosana/glicerol 30%, c) quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5%, sendo estirada	36
Figura 4. Espectros de FTIR para membranas formadas por a) quitosana, b) quitosana/glicerol 30%, c) quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5%.....	38
Figura 5. Imagens para o ângulo de contato entre a água e as membranas formadas por a) quitosana, b) quitosana/glicerol 30%, c) quitosana/glicerol 30%/quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5% em t=1s.....	39
Figura 6. Resistência a tração de membranas de quitosana, quitosana/glicerol 30% e quitosana/glicerol 30%/quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5%. Gráfico A: força X deslocamento; Gráfico B: tensão versus deformação	42
Figura 7. Evolução macroscópica das feridas	43
Figura 8. Índice de reparo de feridas	44
Figura 9. Análise histológica descritiva.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPs - nanopartículas de prata

CD35 - vesícula secretora

CD63 - grânulos azurófilos

CD66b - grânulos de gelatinase

DC - depois de cristo

FTIR - espectroscopia na região do infravermelho

HCl - ácido clorídrico

HP- γ -CyD - hidroxipropil- γ -ciclodextrina

IL-1 - interleucina-1

LPS - lipopolissacarídeos

NaOH - hidróxido de sódio aquoso

NF- κ B - fator nuclear κ B

-NH₃⁺ - íon amônio

PEG - polietileno Glicol

pH - potencial Hidrogeniônico

PPAR- γ - peroxissoma

TAT - trombina-Antitrombina Humana

TNF- α - necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1 Pele e cicatrização do tecido epitelial	19
3.3.1 Fase Inflamatória.....	20
3.1.1 Fase proliferativa.....	21
3.1.2 Fase de Remodelação.....	22
3.2 Quitosana	23
3.3 Cúrcuma e Curcumina.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Materiais	30
4.2 Produção das membranas.....	30
4.3 Caracterização das Membranas.....	30
4.3.1 Medidas de espessura	30
4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	31
4.3.3 Ângulos de contato	31
4.3.4 Ensaios Mecânicos	31
4.4 Testes <i>In Vivo</i>	32
4.4.1 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS.....	32
4.4.2 ANIMAIS	32
4.4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	32
4.4.4 Coleta das Amostras.....	33
4.4.5 Eutanásia	33
4.4.6 ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	33
4.4.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÍNDICE DE REPARO DE FERIDAS.....	33
4.4.8 Análise histológica.....	34
4.4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Formações das membranas	35
5.2 Caracterizações.....	36
5.2.1 Medidas de espessura	36

	14
5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).....	36
5.2.3 Ângulos de contato	38
5.2.4 Ensaio mecânico de tração	40
5.3 Testes <i>In vivo</i>	43
5.3.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	43
5.3.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÍNDICE DE REPARO DE FERIDAS	43
5.3.3 Análise histológica descritiva	44
6 Discussão	47
Formação e caracterização das membranas.....	47
7 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e desempenha as funções de proteção do corpo contra danos, excreção excessiva de água, regulação da temperatura corporal e percepção de estímulos externos (RODRIGUES, B.F.F.S, 2012). A pele pode ser ferida por queimaduras, úlceras de pele e diabetes, e quanto maior a perda de pele, maior a chance de infecção, invalidez ou até morte. O reparo de feridas é desafiador devido ao seu tempo de recuperação, durante o qual outras complicações podem ocorrer. A reparação tecidual é um processo fisiopatológico complexo e dinâmico que envolve três fases distintas: inflamação, formação e deposição do tecido de granulação e remodelamento da matriz extracelular (OLIVEIRA E DIAS, 2012).

No entanto, quando essas feridas são crônicas, geralmente com infecções, persistência da reação inflamatória e estresse oxidativo intenso, apresentam reparação retardada. Nesse contexto, o cuidado adequado de feridas crônicas tornou-se um desafio na saúde pública, muitas vezes incluindo terapias avançadas, com o desenvolvimento e uso de novos medicamentos, utilização de biopolímeros e terapia por fotobiomodulação (LIMA, et al, 2012; CUNHA et al., 2019).

Diversos estudos, como o desenvolvido por Liu et al (2018), mostraram que curativos a base de quitosana podem promover a reparação de feridas em diferentes estágios de cicatrização de feridas, além de aliviar os fatores contra a cicatrização de feridas, sabemos que a resposta inflamatória é a base da cicatrização, mas a inflamação excessiva pode levar à necrose das células teciduais locais, fator que dificulta esse processo. Assim como no estudo de PARK et al. (2018), que avaliou o efeito da quitosana com a sílica em porcos, onde os resultados mostraram que a utilização da membrana acelerou o fechamento da ferida, aumentando a contração e a reepitelização. Já Leng et al. (2020) desenvolveram um filme contendo nanopartículas de curcumina, colágeno e álcool polivinílico que apresentou uma taxa de cura rápida de 98,03%.

Inúmeros são os biomateriais que visam o desenvolvimento e testes de novos agentes reparadores para o tratamento de lesões cutâneas, pois embora existam, comercialmente, diversas opções de curativos e tratamentos para estas lesões, grande parte dos produtos apresenta custo elevado ao paciente (FRÁGUAS et al., 2015). Além disso, é desejável um curativo que atenda idealmente às demandas de

reparo rápido da ferida, com propriedades mecânicas adequadas, propriedade anti-infecciosa e histocompatibilidade favorável, entre outras características (XU et al., 2015).

Neste contexto, a quitosana surge como uma alternativa para o tratamento de lesões cutâneas, uma vez que é um polissacarídeo de ocorrência natural obtido principalmente por desacetilação no estado sólido em condições alcalinas ou por hidrólise enzimática a partir da quitina (KRAVANJA et al., 2019). Dentre as propriedades benéficas da quitosana para aplicação no reparo de feridas, destacam-se a biocompatibilidade, biodegradabilidade e toxicidade baixa, além de propriedades antibacterianas, hemostáticas e mucoadesivas (PATRULEA et al., 2015).

Além da quitosana, a curcumina tem sido muito utilizada para o tratamento de certas doenças e problemas de pele (NIRANJAN et al., 2019). A curcumina é o principal componente ativo da cúrcuma, apresentando efeitos antioxidantes e antiinflamatórios significativos (NASCIMENTO, JUNIOR E BRANCO, 2020). Tal fato resultou no interesse da comunidade científica por esta substância e, como resultado, um grande número de experimentos tem sido conduzido com ela para uma ampla gama de aplicações, isso também é contribuído pelo fato de que a curcumina não é tóxica, mesmo se ingerida a uma taxa de 4 g por dia por até 4 meses (NIRANJAN et al., 2019).

O estudo de Borges et al. (2019) através de uma revisão de literatura apresentou o que se tem descoberto e comprovado cientificamente quanto à atividade antioxidante da cúrcuma. Assim como na revisão realizada por Tabosa, Santos e Siqueira (2020), que demonstram um grande potencial da cúrcuma para o tratamento da radiodermatite. Faria (2016), buscou avaliar a ação antioxidante da cúrcuma em homens saudáveis, além de analisar os marcadores de inflamação, dano e dor muscular após uma meia maratona. E puderam observar ao final que a suplementação de cúrcuma não diminuiu o dano muscular, entretanto foi observada melhora no desempenho, aumento nas concentrações de IL-10 e redução na sensação de dor. Contudo todos eles enfatizaram a importância de mais pesquisas científicas em torno dessa possível ferramenta terapêutica.

Com base no exposto, esse estudo visou a produção e caracterização de membranas à base de quitosana e cúrcuma e sua utilização em lesões de pele. Para tanto, as membranas foram produzidas através da técnica de formação de filmes

casting (evaporação do solvente) caracterizadas por técnicas físico-químicas e mecânicas. Após a produção e caracterização, as membranas foram utilizadas em testes *in vivo* para verificar o potencial reparador das membranas de quitosana pura e quitosana/cúrcuma em feridas de pele induzida em ratos. Justifica-se o uso da quitosana e cúrcuma na produção das membranas, devido as suas conhecidas propriedades antioxidante, reparadora e anti-microbiana respectivamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Confeccionar e avaliar, in vivo, o potencial reparador de membranas de quitosana e cúrcuma em combinação, no reparo de pele.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir membranas à base de quitosana e cúrcuma através da técnica de formação de filmes *casting* (evaporação do solvente).
- Caracterizar as propriedades físico-químicas e mecânicas das membranas produzidas;
- Verificar o potencial de reparo das membranas de quitosana pura e quitosana/cúrcuma em feridas de pele induzidas em ratos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Pele e cicatrização do tecido epitelial

A pele representando cerca de 16% da massa corporal, sendo considerada o maior órgão do corpo humano. Apresenta uma estrutura complexa que se divide em três camadas: epiderme, derme e hipoderme. Este importante órgão desempenha uma vasta gama de funções resultantes de reações físicas e químicas dentro destes componentes. A sua principal função é atuar como uma barreira protetora entre o meio exterior e os órgãos e tecidos internos, visto que é elástica, pilosa e autorregenerativa. Além dessas, outras funções são conhecidas, tais como prevenir a perda de líquidos, exercer a termorregulação, e manter o sistema nervoso em contato com o meio ambiente (MENDES., 2017).

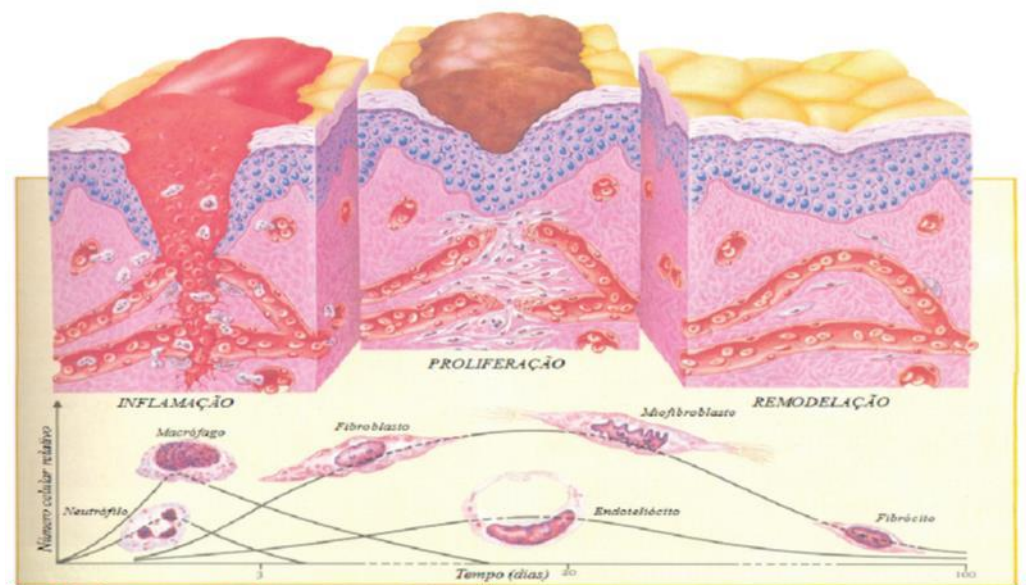
As duas camadas da pele possuem células com características específicas e funções diferentes entre si. A epiderme formada por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, funciona como barreira e os queratinócitos, principais células constituintes desta camada, são responsáveis pela coesão estrutural. Já a derme confere as propriedades mecânicas à pele, é formada por tecido conjuntivo frouxo e conjuntivo denso não modelado, e os fibroblastos e macrófagos são encontrados nessa região. Subjacente à estas duas camadas, encontra-se um tecido adiposo subcutâneo, a tela subcutânea, formado por adipócitos (SZWED, D. N.; SANTOS, V.L.P., 2015).

A perda da integridade da pele, devido a algum tipo de lesão, pode levar a um desequilíbrio fisiológico, uma vez que a pele desempenha múltiplas funções, se esse desequilíbrio não for devidamente tratado poderá resultar numa perda de viabilidade do tecido ou até mesmo na morte do indivíduo. O reparo tecidual não é um processo linear, mas sim uma integração de vários processos interativos e dinâmicos, envolvendo as células parinquematosas, os elementos figurados do sangue e uma matriz extracelular (RODRIGUES, B.F.F.S., 2012).

Imediatamente após uma lesão, uma série de eventos bioquímicos se estabelece para reparar o dano e promover a cicatrização. Estes eventos são intercedidos e sustentados por mediadores bioquímicos, descritos em diferentes fases. O processo de reparação tecidual é dividido em fases, com limites não muito distintos, mas sobrepostas, sendo elas: hemostasia; fase inflamatória; formação do tecido de granulação (proliferação); com deposição de matriz extracelular (colágeno,

elastina e fibras reticulares); e remodelação (OLIVEIRA, I.V.P.M.; DIAS, R.V.C., 2012). Didaticamente, os estágios da cicatrização podem ser resumidos em apenas três, sendo que a hemóstase e a inflamação se juntam, sendo apenas um estágio, seguidas da proliferação e por último a remodelação de tecidos, conforme mostra a Figura 1 (MENDES, S.S., 2017).

Figura 1. Etapas do reparo tecidual



Fonte: figura adaptada de Issac, et al, Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica, Rev Med (São Paulo). 2010 jul.-dez.;89(3/4):125-31. 2010.

Segundo Brito *et al*; (2016) diversos fatores extrínsecos ou intrínsecos ao organismo podem interferir no processo de cicatrização, como a isquemia, infecção, técnicas cirúrgicas, presença de corpo estranho, a idade e genética do paciente, suas comorbidades, níveis hormonais e estado nutricional. A reparação tecidual envolve um processo complexo, no qual uma sequência de reações biológicas é desencadeada, com o intuito de reconstituir o tecido lesado, promovendo assim sua restauração.

3.3.1 Fase Inflamatória

Essa fase depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação, tendo início após o surgimento da ferida. Após um dano tecidual, as alterações nas células endoteliais, a ruptura de vasos sanguíneos e o extravasamento de seus constituintes

incitam compostos vasoativos a promoverem uma vasoconstrição imediata, visando diminuir a perda sanguínea para o espaço extravascular (Kumar et al., 2005).

Um coágulo composto por fibrina restabelece a homeostase fornecendo um ambiente para que fatores de crescimento sejam liberados pelas plaquetas. O coágulo atua nas bordas da ferida, diminuindo a perda de sangue e fluidos, protegendo o organismo contra agentes externos e disponibilizando uma matriz provisória para o início da organização da ferida (OLIVEIRA E DIAS, 2012). Os mediadores do processo inflamatório recrutam macrófagos e neutrófilos, que secretam diversos fatores específicos, que regem as fases seguintes do processo de reparação tecidual. A resposta inflamatória se inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia (RODRIGUES, 2012).

As primeiras células a alcançarem o local da ferida nesta fase são os neutrófilos e os monócitos, com a função de desbridar as superfícies da ferida e fagocitar as partículas estranhas. O pico de atividade destas células ocorre nas primeiras 24-48 horas após o trauma, seguindo-se de um maior aporte de macrófagos durante os dois a três dias seguintes. O macrófago, também ativa os elementos celulares das fases subsequentes da cicatrização, tais como fibroblastos e células endoteliais (OLIVEIRA, I.V.P.M., DIAS, R.V.C., 2012).

3.1.1 Fase proliferativa

A fase proliferativa pode ser dividida em quatro eventos que se acumulam: reepitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno, estas sucedem o período de maior atividade da fase inflamatória. Esta fase inicia-se por volta do 3º dia após a lesão, perdurando por 2 a 3 semanas e é o marco inicial da formação da cicatriz (SZWED, D. N.; SANTOS, V.L.P., 2015).

Nas primeiras 24 a 36 horas após a lesão, fatores de crescimento epidérmicos estimulam a proliferação de células do epitélio. Tendo início a migração dos queratinócitos da borda da ferida, com a ajuda dos fatores plaquetários, fibronectina, fibrina, colágeno e pelas citocinas, induzindo a contração e a reepitelização da ferida e, assim, reduzindo a sua superfície. Na pele os queratinócitos são capazes de sintetizar diversas citocinas que estimulam a cicatrização. As células epiteliais

movem-se, aos saltos e desordenadamente, até as bordas, aproximando-as. A epitelização envolve uma sequência de alterações nos queratinócitos: separação, migração, proliferação, diferenciação e estratificação (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A angiogênese ou neovascularização caracteriza-se pelo crescimento de capilares oriundos dos vasos adjacentes a lesão, induzidos pelas citocinas das células vizinhas e pela matriz extracelular, também conhecida como substância fundamental, esta, substitui rapidamente o coágulo depositado no leito da ferida logo após o trauma. A principal função da matriz é a restauração da continuidade do tecido lesado, funcionando como um arcabouço para a migração celular. Os fibroblastos irão ordenar os feixes de colágeno produzidos, além de serem arcabouço para os vasos neoformados (RODRIGUES, B.F.F.S., 2012).

Como consequência da angiogênese, o tecido conjuntivo é formado, recebendo a denominação de tecido de granulação, devido a sua aparência granular, pela presença de inúmeros capilares. Esse tecido é produzido de três a quatro dias após a indução da lesão, como um processo intermediário entre o desenvolvimento da malha formada por fibrina e fibronectina e a reestruturação de colágeno. Uma vez restabelecidos o fluxo sanguíneo e a oxigenação, o principal fator desencadeador da angiogênese é reduzido, e os vasos neoformados começam a diminuir (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

A contração da ferida, tem início cerca de 2 semanas após a lesão, pela contração dos fibroblastos, que se diferenciam em miofibroblastos, que são células presente no tecido de granulação e conferem capacidade contrátil, reduzindo a área de sangramento e facilitando a epitelização. Os miofibroblastos aproximam as margens da ferida, forçando as fibras de colágeno a se sobreporem e se entrelaçarem, sua atividade contrátil é responsável pelo fechamento das feridas após as lesões (PAGANELA et al., 2009)).

3.1.2 Fase de Remodelação

A remodelação da ferida caracteriza-se por um aumento da resistência, sem aumento na quantidade de colágeno. Há um equilíbrio de produção e destruição das fibras de colágeno neste período, por ação da colagenase, que é secretada por fibroblastos e leucócitos (BRITO, 2016).

A principal célula desta fase são os fibroblastos que produzem o colágeno e o depositam de maneira organizada. O colágeno é uma proteína encontrada abundantemente na matriz extracelular, fundamental na organização do tecido e na resistência, sendo a mais abundante do tecido conectivo em fase de cicatrização. O colágeno tipo III é substituído progressivamente pelo colágeno tipo I, um colágeno mais espesso e resistente, e organizado ao longo das linhas de tensão. Devido a essas mudanças há um aumento da força tênsil da ferida (SOUZA, CASTRO E SILVA, 2021).

Sequencialmente as fibras colágenas tornam-se mais grossas e conseqüentemente, mais regulares, o que está diretamente relacionado ao aumento na sua força mecânica. Assim, o tecido torna-se mais resistente após o colágeno passar por maturação. Com a evolução do processo, diminui a deposição de colágeno e a maioria das células desaparece, formando finalmente o tecido cicatricial (MACÊDO, 2013).

3.2 Quitosana

A quitina é o segundo polissacarídeo e fonte de carbono renovável abundante na natureza após a celulose com uma produção de cerca de 1 trilhão de toneladas por ano. Presente na forma alfa predominante é um polímero composto por unidades lineares *N*-acetil-glucosamina ligadas por ligações glicosídicas β - (1→4), (MORGANTI; COLTELLI, 2019). Resultando em longas cadeias poliméricas antiparalelas.

A estrutura química da quitina tem o maior número de unidades estruturais 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose definidas como grau de acetilação. O principal derivado da quitina é a quitosana, um polissacarídeo catiônico natural formado por unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose ligadas por ligações glicosídicas β -(1 → 4). A produção industrial de quitosana está dividida em etapas que consistem na separação das cascas de caranguejos, camarões, e lagostas por máquinas de descasque e mais duas etapas seguintes: desmineralização, geralmente realizada utilizando-se ácido clorídrico (HCl) e desproteínização, geralmente realizada utilizando-se hidróxido de sódio aquoso (NaOH) (MOEINI et al., 2020).

As principais fontes comerciais da quitina são carapaças de camarões e caranguejos (HASSAINIA, SATHA e BOUFI, 2018). Apesar de ser muito abundante

e possuir excelentes propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade, a utilização da quitina é limitada devido à baixa solubilidade em meios aquosos e na maioria dos solventes. Nesse caso, destacam-se os estudos utilizando a quitosana, principal derivado da quitina, que apresenta melhor solubilidade em solventes como solução aquosa, por exemplo (MUXICA et al., 2017).

As características físico-químicas da quitosana são importantes para o entendimento de suas propriedades funcionais. Por exemplo, o grau de acetilação, que se refere à fração ou porcentagem de grupos amino ao longo da cadeia polimérica, determina uma das características mais importantes da quitosana, sua natureza policatiónica em meio ácido, resultante da ionização dos grupos amino. Assim, as propriedades funcionais da quitosana, como solubilidade, razão de intumescimento, bioatividade e biodegradação, são influenciadas pelo grau de acetilação (MATICA et al., 2019).

O peso molecular também pode variar e influenciar suas propriedades físicoquímicas, como viscosidade, solubilidade, elasticidade e resistência à ruptura. Por exemplo, no estudo de Moeini et al. (2020), quitosana com peso molecular médio mostrou melhores propriedades antimicrobianas, enquanto a quitosana com o peso molecular mais baixo apresentou o maior efeito inibitório sobre o fitopatógeno. No entanto, independentemente do peso molecular, a quitosana apresenta maior ação contra bactérias gram-positivas. Três grupos funcionais (amino, acetamido e grupos hidroxila primários e secundários) da quitosana permitem modificação para obter diferentes derivados, possibilitando ampla variedade de aplicações (MOEINI et al., 2020).

Existem dois mecanismos principais pelos quais a quitosana atua como agente antimicrobiano e cicatrizante. O primeiro mecanismo refere-se à existência de interação de grupos aniônicos na superfície celular com grupos catiónicos nas cadeias de polímero de quitosana. O aumento no número de carga positiva na forma de $-NH_3^+$ nas cadeias poliméricas da quitosana faz com que ele se ligue mais fortemente às paredes celulares das bactérias e, portanto, tenha alta atividade antibacteriana. Essa interação pode desenvolver uma camada impermeável em torno das células bacterianas e inibir o transporte de solutos vitais. No outro mecanismo, a quitosana se difunde no núcleo da célula e inibe sua síntese (BANO et al., 2017). Outros parâmetros influenciam a atividade antimicrobiana e cicatrizante da quitosana, como pH, solubilidade e temperatura (KIM, 2018). Além dos

parâmetros mencionados, as propriedades antimicrobianas da quitosana também podem ser dependentes de especificidades do microrganismo, concentração de polímero, capacidade quelante, efeito nos metabólitos celulares e estado sólido na quitosana (MOEINI et al., 2020).

De fato, as propriedades antimicrobianas e cicatrizantes da quitosana podem ser vistas em estudos que demonstra que o polímero promove o reparo de feridas induzindo a formação óssea e apresentando também efeitos inibitórios em microrganismos como *Candida albicans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudo-monas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (TRIPLETT; BUDINSKAYA, 2017).

Outros estudos apresentam a atividade cicatrizante da quitosana. Liu et al (2018) apresentam estudo onde hidrogéis à base de quitosana foram desenvolvidos e desempenham um papel positivo em várias fases do reparo de feridas. Na fase de coagulação e hemostasia, a quitosana promove a coagulação do sangue, acelerando a ativação das plaquetas. Na fase inflamatória, os hidrogéis à base de quitosana podem acelerar a reparação de diferentes tecidos e regular a secreção de mediadores inflamatórios, como interleucina 8, prostaglandina E, interleucina 1 β e podem potencializar as funções inflamatórias de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e neutrófilos, promovendo a granulação do tecido para uma resposta inflamatória adequada. Na fase proliferativa, a quitosana irá despolimerizar gradualmente para liberar N-acetilglucosamina, estimulando a proliferação de fibroblastos, angiogênese, deposição regular de colágeno e aumentando o nível de síntese de ácido hialurônico natural no local da ferida. Já na fase de remodelação, a N-acetil-glucosamina, constituinte da quitina e quitosana, é o principal componente do tecido dérmico, essencial para o reparo de tecidos cicatrizados (LIU et al., 2018).

Biranje et al. (2019) desenvolveram nanopartículas de quitosana pelo método de gelificação iônica e fabricaram um curativo de quitosana porosa, por liofilização. Experimentos in vitro com fibroblastos dérmicos humanos demonstraram uma atividade hemostática acelerada, por meio de maior geração de trombina e formação de coágulo sanguíneo estável. O sangue em contato com o curativo continha níveis duas vezes maiores de Trombina-Antitrombina Humana (TAT), quando comparado ao sangue em contato com o padrão TAT. Dessa forma, os autores confirmaram o potencial do curativo desenvolvido em remover os tecidos necróticos e acelerar a

atividade hemostática, para um reparo rápido e eficiente (Biranje et al. 2019).

Gupta, Rattan e Rai (2019) avaliaram a eficácia de um curativo à base de quitosana no reparo de feridas após a extração do terceiro molar inferior. Os resultados mostram que, na segunda semana, 12 locais apresentaram melhores achados radiográficos no grupo tratado com quitosana enquanto apenas 3 locais no grupo controle. No terceiro mês de estudo, 14 locais mostraram melhora na reparação óssea no grupo tratado com quitosana, enquanto apenas 4 locais no grupo controle. Portanto, concluiu-se que a quitosana é eficaz na promoção do reparo de feridas e na osteogênese precoce na cavidade dentária erupcionada após a extração (GUPTA, RATTAN E RAI, 2019)

Masood et al. (2019) produziram hidrogel de quitosana impregnado com nanopartículas de prata (AgNPs) e utilizaram em feridas de pele de coelhos diabéticos. Os resultados mostraram uma maior porosidade, maior taxa de transição de vapor de água, bem como propriedades antimicrobianas e antioxidantes aprimoradas, além de capacidade aprimorada de reparo das feridas. O hidrogel mostrou liberação lenta e constante de AgNPs ao longo de um período de pelo menos sete dias, demonstrando a cinética lenta de biodegradação do hidrogel desenvolvido (MASOOD et al., 2019).

Song, et al., (2019) desenvolveram e utilizaram hidrogel híbrido de quitosana e cordicepina (substância extraída de cogumelos, muito utilizada na medicina chinesa) em lesões de pele. Os resultados demonstraram uma reepitelização mais rápida da ferida e um aparente aumento da deposição de colágeno em comparação com os hidrogéis formados por quitosana pura. Além disso, a utilização do hidrogel aumentou significativamente as expressões dos marcadores de regeneração epitelial, incluindo laminina e involucrina (SONG et al., 2019).

Resultados semelhantes foram observados, por Park et al., com o uso de uma membrana de esponja marinha composta por quitosana e sílica aplicada em feridas de pele em porcos. Os resultados mostram que a utilização da membrana acelerou o fechamento da ferida, aumentando a contração e a reepitelização através do aumento do recrutamento celular, maturidade epidérmica, neovascularização e formação de tecido de granulação em comparação com a utilização da quitosana pura e outros materiais curativos comerciais (PARK et al., 2018).

3.3 Cúrcuma e Curcumina

A cúrcuma é derivada da planta *Curcuma longa*, uma planta herbácea perene da família Zingiberácea. Por causa de sua cor, também é chamado de açafrão indiano. Ela cresce selvagem na Índia e é cultivada em muitos países com climas tropicais, como Índia, Paquistão, China e Haiti. Essa planta produz metabólitos secundários, tais como: ácidos fenólicos, flavonóides, alcalóides, terpenóides, taninos e saponinas, cujas propriedades biológicas são conhecidas há séculos (LICZBINSKI; MICHALOWICZ; BUKOWSKA, 2020).

Dentre uma ampla gama de fitoquímicos ativos que contém, a curcumina, também conhecida como diferuloilmetano, extraída de seus rizomas, é o principal componente biologicamente ativo que constitui a base para as propriedades biológicas e a maioria dos efeitos terapêuticos. A curcumina é o pigmento amarelo ou laranja insolúvel em água, que compõe 2% a 5% da planta e lhe dá a cor amarelo-alaranjada. Desde o século VII DC, foi descrito que a curcumina era usada para a saúde e preservação de alimentos na medicina tradicional chinesa e indiana (Ayurveda) (TANG et al., 2020).

Em 1910, Milobedzka e colegas descreveram pela primeira vez a estrutura da curcumina (BARCHITTA et al., 2019). Em 1949, estudo sobre as propriedades antibacterianas da curcumina foi publicado pela primeira vez na revista *Nature* (OLIBERS', 1949, apud TANG et al., 2020). Desde então, foi demonstrado que a curcumina possui propriedades antioxidantes, antitumorais, antibacterianas, antifúngicas, antivirais e de reparo de feridas (FARHOOD et al., 2019; LIAO et al., 2018; OHNISHI et al., 2020; LICZBINSKI; MICHALOWICZ; BUKOWSKA, 2020; TYAGI et al., 2015; LI et al., 2020; WATHONI et al., 2017).

No que diz respeito aos efeitos anti-inflamatórios, vários estudos têm revelado o efeito protetor da curcumina, que reduz a expressão de citocinas e regula muitos genes implicados na iniciação de respostas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1 (IL-1). Conseqüentemente, a curcumina recruta macrófagos tipo M2 (com propriedades anti-inflamatória e pró-angiogênica), que alteram sua polaridade funcional, aumentando assim a produção de citocinas antiinflamatórias essenciais para o reparo tecidual. Por outro lado, a curcumina evita o comportamento inflamatório relacionado a dor causado pela superestimulação de citocinas pró-inflamatórias, por aumentar a produção de interleucina-10 (IL-10), uma

citocina antiinflamatória (SONG et al., 2018).

Além disso, a curcumina também inibe o fator nuclear κ B (NF- κ B) ao suprimir a atividade das quinases envolvidas em várias vias. Em geral, o NF- κ B é fisiologicamente inativado pela ligação ao seu inibidor I κ B. Durante a inflamação, a regulação positiva de mediadores inflamatórios (ou seja, citocinas e quimiocinas) ativa o NF- κ B, que por sua vez se transloca para o núcleo. Em locais feridos, a curcumina pode reduzir a inflamação causada pela ativação da via do NF- κ B (BARCHITTA et al., 2019).

Estudos mostram que a curcumina pode efetivamente reduzir os níveis de expressão de IL-1 β , de citocinas pró-inflamatórias séricas, incluindo IL-6, TNF- α e IL-1 β , e os níveis de expressão de TLR4, TLR2 e TNF- α , além de suprimir a ativação de NF- κ B e os níveis de degradação de I κ B α (WANG et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que a curcumina inibe o complexo de sinalização TLR4-MD2 por meio da competição com lipopolissacarídeos (LPS) pela ligação a proteína de diferenciação mielóide 2 (MD2) (ZHANG et al., 2018).

Outro estudo, desenvolvido por Antoine e Girard (2015) indicou que a curcumina induz a desgranulação em neutrófilos humanos, aumentando a expressão da superfície celular de CD35 (vesícula secretora), CD63 (grânulos azurófilos) e CD66b (grânulos de gelatinase). Além disso, a curcumina aumentou a liberação e a atividade enzimática da gelatinase B no meio extracelular e ativou a p38 MAP quinase nessas células, sendo capaz de aumentar a fagocitose (ANTOINE; GIRARD, 2015).

Já nos estudos conduzidos por Li et al., experimentos utilizando ratos, demonstraram que a curcumina inibiu a expressão de IL-6 e TNF- α , diminuiu a produção de óxido nítrico e suprimiu a proliferação de células do músculo liso vascular, aumentando a atividade do proliferador de peroxissoma (PPAR- γ) e suprimindo o estresse oxidativo para estimular respostas inflamatórias induzidas por angiotensina II (Li et al., 2017).

Além das propriedades já mencionadas, a curcumina é conhecida como um potencial agente no reparo de feridas devido às suas propriedades anti-infecciosas, anti-inflamatórias e antioxidantes, promovendo a formação do tecido de granulação, a remodelação do tecido e a deposição de colágeno (FEREYDOUNI et al., 2018). Leng et al. desenvolveram um filme contendo nanopartículas de curcumina,

colágeno e álcool polivinílico que apresentou uma taxa de cura rápida de $98,03\% \pm 0,79\%$ e epitelização madura no 15º dia após a indução da ferida em ratos, confirmando que o filme pode promover a formação de fibras de colágeno. Folículos capilares e reepitelização precoce também foram observados no grupo tratado (LENG et al., 2020).

Um estudo publicado por Mirzahosseini-pour et al. mostra que nanopartículas compostas de curcumina e sílica reduziram o número de bactérias em estado planctônico, a produção de biofilme bacteriano, apresentando propriedades de reparo de feridas (MIRZAHOSSEINIPOUR et al., 2020).

Wathoni et al. demonstraram que um complexo de curcumina e 2-hidroxi-propil- γ -ciclodextrina (HP- γ -CyD) em hidrogel à base de sacrano promoveu uma maior capacidade de reparo de feridas em camundongos (WATHONI et al, 2017). Já estudo conduzido por Nguyen et al. mostrou que nanocomplexos de curcumina e oligoquitosana, preparados pelo método de complexação de fármaco-polissacarídeo, e lipossomas encapsulados por curcumina revestidos com oligoquitosana, preparados por um método de combinação de hidratação de filme lipídico e sonicação, resultaram em um reparo tecidual mais rápido e de maior eficácia do tratamento da cicatriz em ratos (NGUYEN et al., 2019).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

A amostra de quitosana foi obtida comercialmente (Sigma-Aldrich, São Paulo – SP, Brasil) e possui massa molecular média. O glicerol (Gli) e o ácido acético foram obtidos da LabSynth (São Paulo, Brasil) e utilizados conforme recebidos. A amostra de Cúrcuma longa foi obtida comercialmente da Farmácia Malheiros, São Paulo-SP, e utilizada conforme recebida.

4.2 Produção das membranas

As membranas foram produzidas no Laboratório de Nanociências Aplicadas e Tecnologia de Plasma do Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, através da evaporação do solvente (método *casting*) a partir de uma solução de quitosana a 1% p/p dissolvida em solução aquosa de ácido acético 10% (v/v). As membranas de quitosana mistas com glicerol na proporção de 30% (p/p em relação a massa de quitosana) foram produzidas através da mistura de glicerol em solução de quitosana e agitadas por 15 minutos, resultando em uma solução homogênea. As membranas mistas com cúrcuma foram produzidas utilizando-se o extrato de cúrcuma longa solubilizada na concentração de 1,5% (p/p em relação a massa de quitosana) na solução de quitosana/glicerol 30%. Para tanto 20 mg de cúrcuma foram solubilizados em 15 ml de álcool etílico e misturados com 10 ml da solução homogênea. Para a produção das membranas, 10 ml de solução foram pipetadas em placas de silicone e, as amostras foram secas ao ar em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) em fluxo de ar. O tempo de secagem das membranas foi de 24 a 48h

4.3 Caracterização das Membranas

4.3.1 Medidas de espessura

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

4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

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

4.3.3 Ângulos de contato

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

4.3.4 Ensaios Mecânicos

Ensaios mecânicos de tração foram realizados para todas as amostras, utilizando corpo de prova de 15 mm x 10 mm (comprimento x largura). Os testes foram feitos utilizando máquina de ensaio universal da marca Biopdi, modelo MBIO1 - portátil (São Carlos, São Paulo). Os ensaios foram realizados utilizando célula de carga de 50 N taxa de deformação constante (velocidade de deslocamento do travessão) de 5 mm/min.

4.4 Testes *In Vivo*

4.4.1 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

O presente estudo segue todas as premissas éticas para o uso de animais em pesquisas científicas e foi aprovado no Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Piauí (UESPI) (protocolo 01987/2021-10) (Anexo A).

4.4.2 ANIMAIS

Para a realização deste estudo foram selecionados 24 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, com 60 dias de vida e média de peso corporal $250 \text{ g} \pm 6,6 \text{ g}$ provenientes do Biotério da UESPI. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, de polietileno, devidamente etiquetadas, os quais estiveram 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*.

4.4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Para a realização das feridas cutâneas, todos os animais foram previamente anestesiados intraperitoneal com de cloridrato de ketamina, na dose de 60-80 mg/kg, e cloridrato de xilazina , na dose de 10 mg/kg. Após a tricotomia na região dorsal, foi realizada a indução de três feridas cutâneas, removendo todas as camadas da pele, com a utilização de punch dermatológico de 1 cm de diâmetro, equidistante 1 cm entre si.

Foi administrado medicação analgésica, paracetamol 200 mg/ml de 8 em 8 horas, por 3 dias.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais:

- Grupo controle: animais com a indução da ferida cutânea e não receberam nenhum tratamento (n= 6 animais);
- Grupo quitosana: animais com a indução da ferida cutânea e receberam a membrana de quitosana (n= 6 animais);
- Grupo quitosana / glicerol 30 %: animais com a indução da ferida cutânea e receberam a membrana de quitosana / glicerol 30 % (n= 6 animais);
- Grupo quitosana / glicerol 30 % / cúrcuma 1,5 % : animais com indução da

ferida cutânea e receberam a membrana de quitosana / glicerol 30 % / cúrcuma 1,5 % (n= 6 animais).

A aplicação da membrana ocorreu imediatamente após a indução da ferida cutânea. A membrana foi recortada com um puch dermatológico de 1 cm e colocada com auxílio de uma pinça cirúrgica em cima de cada ferida.

4.4.4 Coleta das Amostras

A coleta das amostras de pele incluiu toda a extensão das feridas, com margem de 1 cm de pele íntegra, no 3°, 7° e 14° dia.

4.4.5 Eutanásia

Os animais sofreram eutanásia, por sobredosagem de anestésico, no 14° dia após a coleta da amostra de ferida cutânea.

4.4.6 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Para a análise macroscópica a região da lesão foi investigada quanto às seguintes ocorrências: necrose, inflamação local, odor, presença de fibrose ou líquido na cavidade.

4.4.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÍNDICE DE REPARO DE FERIDAS

A análise morfométrica foi realizada por meio de registros fotográficos no dia 0, 3, 7 e 14 dias. Foi utilizada uma câmera digital no modo básico, sem flash, sem zoom. Para a padronização da distância da câmera à ferida utilizou um suporte de alumínio a 20 cm e perpendicular à ferida. Uma régua disposta ao lado dos animais e junto à ferida foi utilizada para a padronização da unidade de área das lesões em mm. As imagens foram analisadas pelo software Image J 1,45 (*Research Services Branch, Nacional Institutes of Health – NIH (Bethesda, Maryland, EUA)*). Depois de determinar a área da ferida, o seguinte cálculo foi aplicado: $\frac{\text{área inicial} - \text{área final}}{\text{área inicial}} \times 100$, determinando, assim, o percentual de regressão.

4.4.8 Análise histológica

As amostras da ferida cutânea foram fixadas em solução tamponada de formalina a 10 % durante 24 horas, encaminhadas para o processamento histológico convencional, constando de desidratação com álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Então, os blocos foram cortados em micrótomo rotativo, com cortes de 5 micrômetros de espessura, e submetidos à coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). Todas as lâminas foram codificadas de modo que o examinador não possuía conhecimento sobre a qual grupo pertencia.

As preparações histológicas foram examinadas em microscópio óptico trinocular (Olympus® CX31, Japão), usando a objetiva de 10x, equipado com uma câmera digital (Bell & Howell, EU 16.0 Plus, E.U.A.) acoplada a um microcomputador. Avaliou-se as bordas (área de fronteira entre o tecido conjuntivo intacto e o em formação) e o centro da ferida. Os parâmetros inflamação, crosta, deposição de matriz extracelular, vascularização e epitelização (Estevão et al., 2019).

4.4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização da análise estatística, utilizou o programa estatístico GraphPad Prism® (versão 5.0, InStat Software Inc., La Jolla, CA, EUA). A normalidade dos dados foi testada com o teste de Kolmogorov-Smirnov (KS) e a Homogeneidade com o teste de Levene. Os dados foram avaliados e analisados por meio da análise de variância one-way (ANOVA), seguido de teste de Tukey, com significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Formações das membranas

Após o período de secagem as membranas foram removidas das placas de silicone e mostraram-se homogêneas, conforme mostrado na Figura 2. Conforme podemos observar, a membrana de quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5%, apresentou uma coloração amarelada, característica do pigmento curcumina.

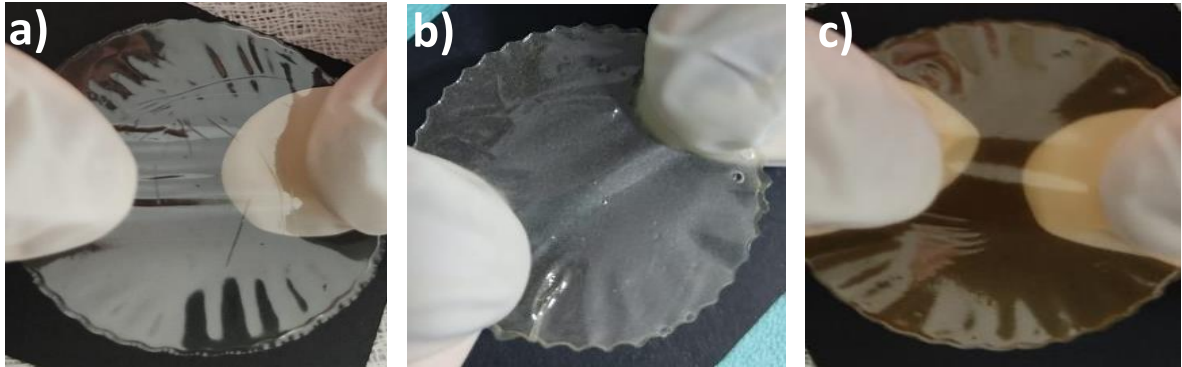
Figura 2. Membranas formadas por a) quitosana, b) quitosana/glicerol 30%, c) quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5%, secas em temperatura ambiente, com fluxo de ar



Fonte: Autor.

Alterações nas propriedades mecânicas das membranas após a adição de glicerol foram evidentes, conforme mostra a Figura 3. Aplicando força de tração similar nas membranas formadas por quitosana pura e quitosana mista com 30% de glicerol podemos ver através das imagens claramente a diferença no comportamento mecânico. Tal comportamento pode ser atribuído as fortes ligações hidrogênio formadas entre as cadeias de quitosana e glicerol que promove maior elasticidade e flexibilidade das membranas. As moléculas de glicerol atuam como plastificantes no processo de formação das membranas. Tais moléculas tem a habilidade de se posicionar entre as cadeias poliméricas da quitosana desfazendo ligações hidrogênio intercadeias do polímero o que faz com que as cadeias da quitosana se afastem, aumentando a flexibilidade (CHEN, M. ET AL., 2018; CARONI ET AL., 2021).

Figura 3. Membranas formadas por a) quitosana, b) quitosana/glicerol 30%, c) quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5%, sendo estirada



Fonte: Autor.

5.2 Caracterizações

5.2.1 Medidas de espessura

Os valores de espessura obtidos foram de $55 \mu\text{m} \pm 10$, $40 \mu\text{m} \pm 10$ e $45 \pm 8 \mu\text{m}$ para as membranas formadas por quitosana, quitosana / glicerol 30% e quitosana / glicerol 30% / cúrcuma 1,5%, respectivamente. Não havendo diferença significativa entre elas.

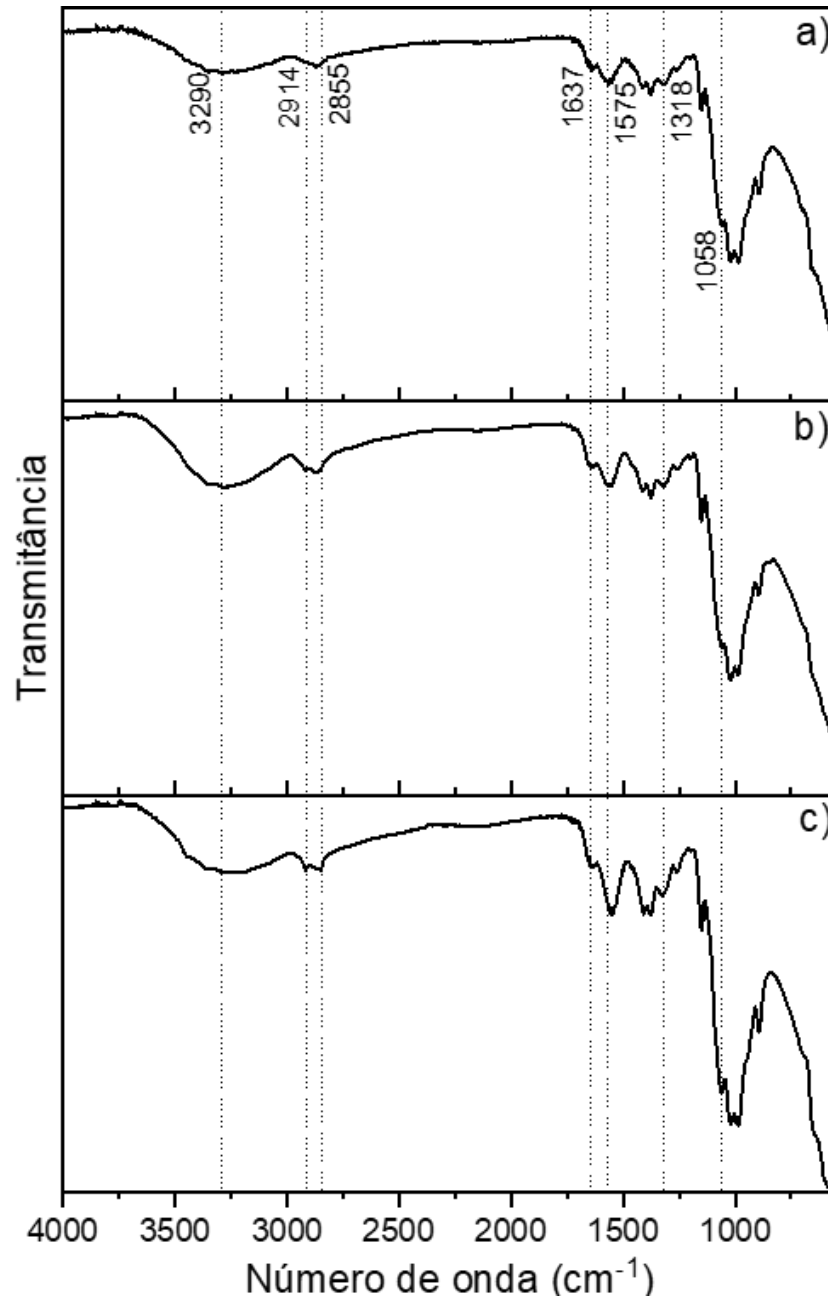
5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Espectros FTIR foram utilizados a fim de se caracterizar os grupos químicos de ambos os materiais nas membranas. Os espectros na região do infravermelho para as membranas, formadas por quitosana pura e membranas mistas são mostrados na Figura 4. As bandas vibracionais típicas correspondentes aos grupos químicos formadores de ambos os materiais foram identificadas da seguinte forma: bandas em $3200\text{-}3500 \text{ cm}^{-1}$ são atribuídas a deformação de O-H sobrepostas a deformação N-H; em $2850\text{-}2970 \text{ cm}^{-1}$ estão associados a vibrações de C-H; em 1637 cm^{-1} à banda de vibração relacionada ao grupo amida I (C = O alongamento) da quitosana; em 1550 cm^{-1} à banda de deformação angular do grupo CH₂ ligado ao grupo carbonila; em 1575 cm^{-1} à banda de amida II (deformação angular N-H) da quitosana; em 1318 cm^{-1} à banda de amida III (C = O-NH₂ deformação axial) da quitosana; e finalmente em 1058 cm^{-1} observa-se uma banda correspondente à deformação angular do C-O da quitosana. É possível observar que as bandas centradas em 3346 cm^{-1} e 3258 cm^{-1}

(atribuídas à deformação OH) e aquelas centradas em 2923 cm^{-1} e 2875 cm^{-1} (atribuídas às cadeias alquílicas) têm sua intensidade aumentada com a adição de glicerol, sendo que nenhuma banda nova foi observada. Todas as bandas foram atribuídas em acordo com a literatura (BRUGNEROTTO et al., 2001).

Já as bandas vibracionais referentes a cúrcuma são: em 3330 cm^{-1} , alongando a vibração dos grupos-O-H; em 3055 cm^{-1} , vibração de alongamento de ligações C-H aromáticas; em 2955 cm^{-1} , vibração assimétrica dos grupos- CH_3 -; em 2930 cm^{-1} , - CH_2 alongamento assimétrico; em 1627 cm^{-1} , alongamento da ligação C=O; em 1587 cm^{-1} , C-C vibração de ligação em aromáticos; em 1510 cm^{-1} , vibração de ângulo deformação do anel benzênico; em 1427 cm^{-1} , deformação angular do grupo CH_2 ; em 1368 cm^{-1} , deformação angular do grupo CH_3 e em 1118 cm^{-1} , estiramento das ligações C-O (DEUS, W.F. et al., 2021). Entretanto, é possível observar que nenhuma banda referente a cúrcuma aparece no espectro da membrana a contém, provavelmente devido a baixa proporção do material na membrana em relação a massa da quitosana.

Figura 4. Espectros de FTIR para membranas formadas por a) quitosana, b) quitosana/glicerol 30%, c) quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5%

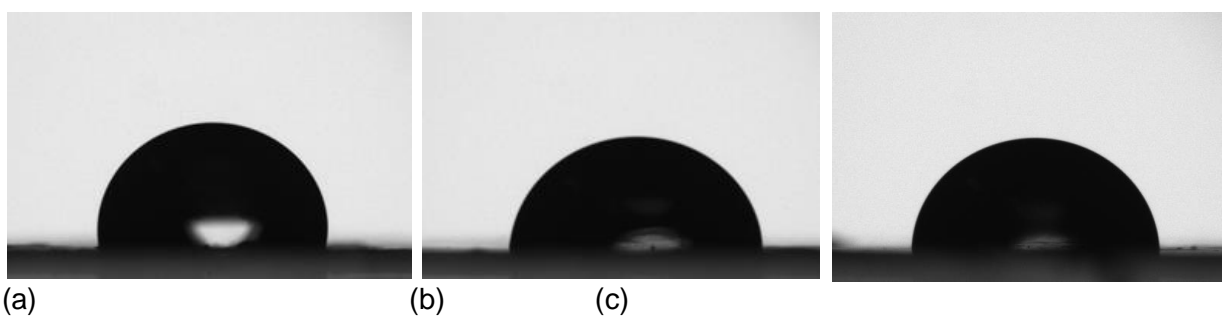


5.2.3 Ângulos de contato

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

LAW (2014) se o ângulo de contato (θ) é $\leq 90^\circ$ o material é considerado hidrofílico, hidrofóbico se $150^\circ \geq \theta > 90^\circ$ e superhidrofóbico se $180^\circ \geq \theta > 90^\circ$. As imagens e os valores do ângulo de contato das membranas estão apresentados na Figura 5 e na Tabela 1, respectivamente. A membrana formada apenas por quitosana apresenta valor de ângulo de contato médio de 104° , indicando característica hidrofóbica, apesar da presença dos grupos amino e hidroxila com caráter hidrofílico nas cadeias de quitosana. Já para as membranas de quitosana/glicerol 30% e quitosana/glicerol 30%/ cúrcuma 1,5%, os valores de ângulo de contato médio foram de 88° e 85° , respectivamente. Assim como a quitosana, a molécula de glicerol tem caráter hidrofílico devido à presença dos grupos hidroxilas em sua estrutura química, o que explica a diminuição nos valores de ângulo de contato para as amostras que contém glicerol. Com base nos resultados de ângulo de contato, é possível afirmar que as membranas que contém glicerol são mais hidrofílicas do que a membrana de quitosana pura. Durante a realização dos experimentos, conforme a água era gotejada na superfície das membranas uma pequena deformação na superfície do material pode ser observada, sugerindo forte interação entre os materiais

Figura 5. Imagens para o ângulo de contato entre a água e as membranas formadas por a) quitosana, b) quitosana/glicerol 30%, c) quitosana/glicerol 30%/quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5% em $t=1s$



Fonte: Autor.

Tabela 1 Valores dos ângulos de contato entre a água e as membranas. O erro corresponde ao desvio padrão calculado em triplicata

Membrana	Ângulo de Contato
Quitosana	104 ± 0,5
quitosana/glicerol 30%	85 ± 1,0
quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5%	88 ± 0,5

5.2.4 Ensaios mecânicos de tração

A Figura 7a mostra as curvas de força *versus* deslocamento obtidas a partir dos ensaios mecânicos de tração, realizados para todas as amostras. Conforme podemos observar, a resistência a tração é maior para a amostra de quitosana pura, onde um valor máximo de 11,3 N foi obtido antes da ruptura da amostra. Já para as outras amostras, menores valores de força foram encontrados antes da ruptura, sendo que para as membranas quitosana/glicerol 30% além da diminuição da resistência a tração, foi observado um aumento na deformação (deslocamento). O perfil da curva obtida para a membrana formada por quitosana/glicerol 30% menor resistência a tração, denotada pela menor inclinação na região de deformação elástica do ensaio, e maior elasticidade, denotada pela maior região plástica de deformação. Tal fato pode ser relacionado ao efeito plastificante do glicerol nas cadeias poliméricas da quitosana, sugerindo maior elasticidade das amostras que contém o plastificante em relação a amostra de quitosana pura.

Gráficos de tensão *versus* deformação foram plotados e são mostrados na Figura 7b. Através desse gráfico é possível determinar o valor do módulo de elasticidade (E) (ou módulo de Young), que corresponde a inclinação (coeficiente angular) do segmento linear do gráfico e é calculado a partir da tangente traçada na região de deformação elástica das amostras, utilizando a seguinte equação (1).

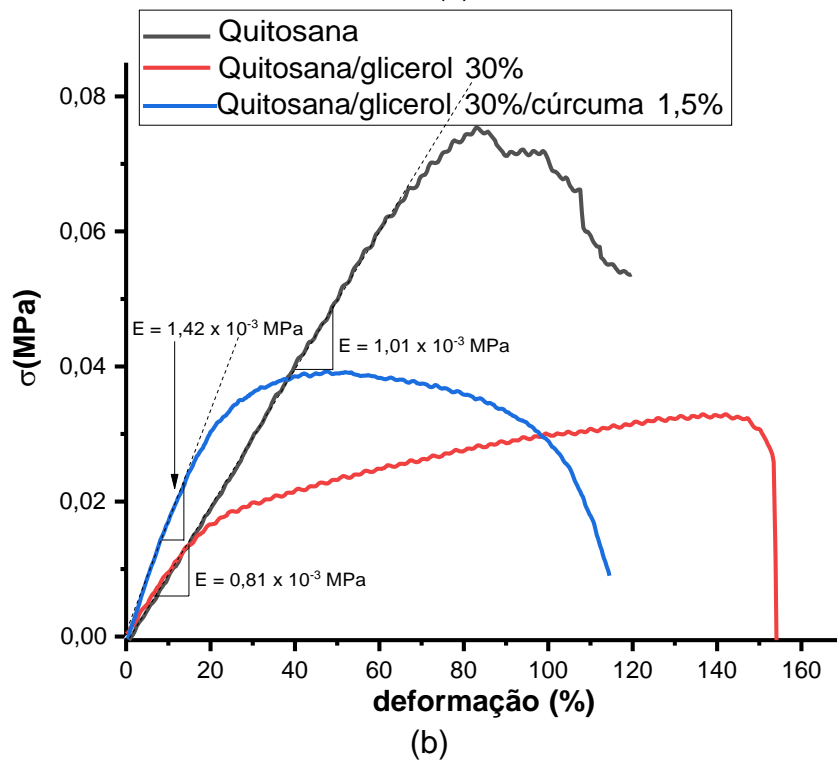
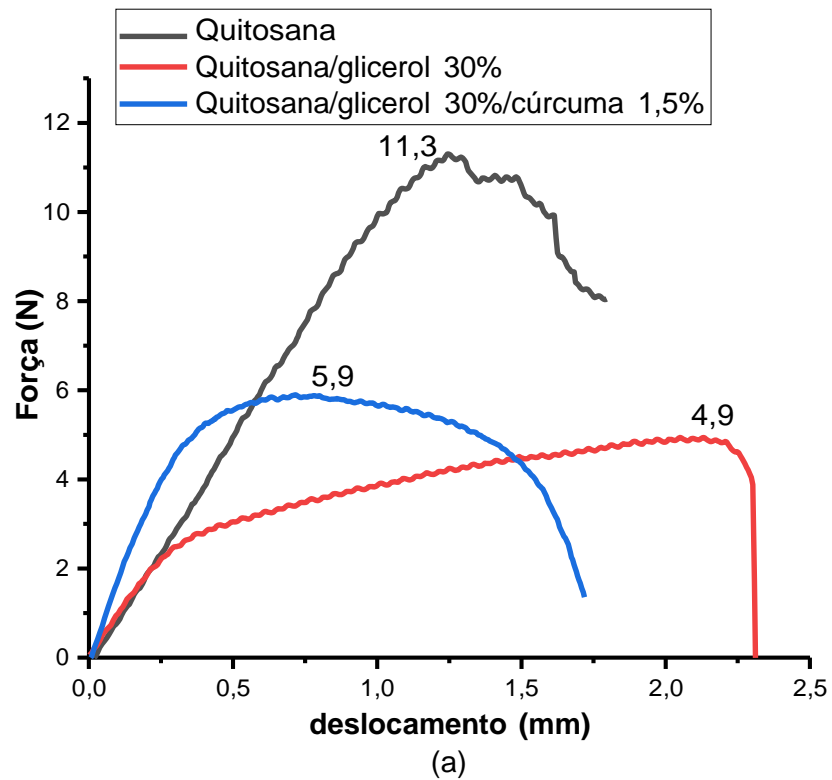
$$\sigma = E \times \varepsilon \quad \text{ou} \quad E = \sigma/\varepsilon \quad (\Delta\sigma/\Delta\varepsilon) \quad (1)$$

onde σ = valor da tensão (MPa), ε = deformação (mm) e E = módulo de elasticidade (MPa). Os módulos de elasticidade obtidos para as membranas de quitosana, quitosana/glicerol 30% e quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5% foram $1,01 \times 10^{-3}$, $0,81 \times 10^{-3}$ e $1,42 \times 10^{-3}$ MPa, respectivamente. Quanto maior o valor de E, mais

rígido é o material ou menor será a deformação elástica para uma mesma carga aplicada. Sendo assim, comprova-se que a membrana contendo cúrcuma é mais rígida do que a membrana de quitosana pura que, por sua vez, é mais rígida do que a membrana plastificada com glicerol 30%. Porém, embora rígida, a membrana contendo cúrcuma possui grande região de deformação plástica, demonstrando maior elasticidade dessa membrana em comparação com a membrana de quitosana pura.

As cadeias poliméricas de quitosana apresentam forte ligações de hidrogênio intermoleculares, resultando na rigidez da membrana formada. A inserção do plastificante (glicerol) ocasiona a redução (quebra) dessas ligações, fazendo com que as cadeias tenham mais mobilidade em se afastar umas das outras e deslizarem umas sob as outras quando estão sob tração, refletindo em maior deformação da membrana (plastificada).

Figura 6. Resistência a tração de membranas de quitosana, quitosana/glicerol 30% e quitosana/glicerol 30%/quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5%. Gráfico A: força X deslocamento; Gráfico B: tensão versus deformação



Fonte: Autor.

5.3 Testes *In vivo*

5.3.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Nos achados macroscópicos obtidos na análise qualitativa dos grupos experimentais, foi possível observar a ausência de necrose, odor, presença de fibrose ou líquido na cavidade da lesão em todos os grupos experimentais (Figura 7).

Figura 7. Evolução macroscópica das feridas

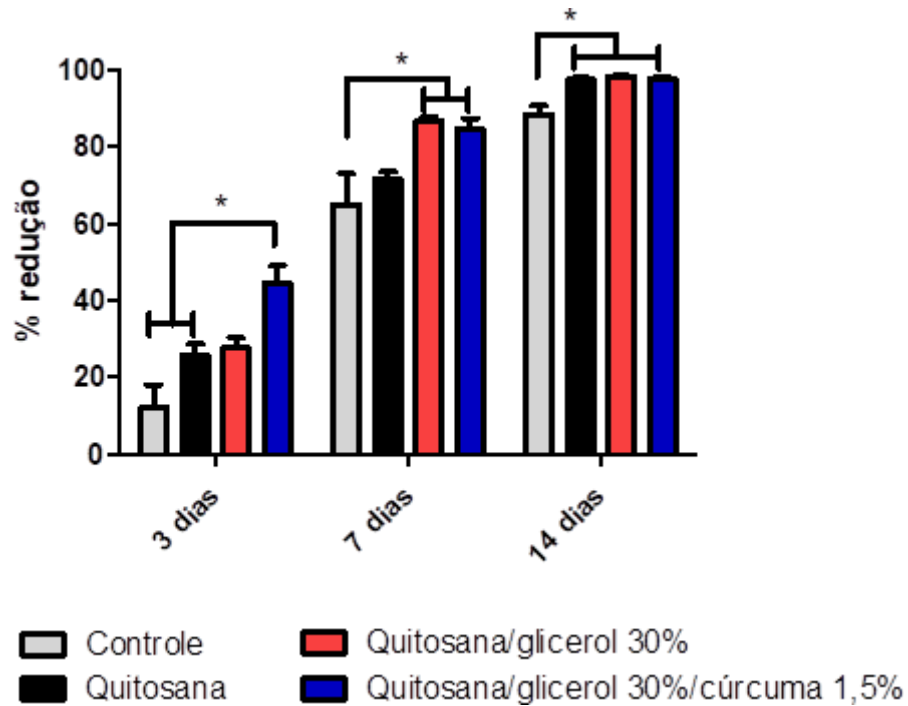


5.3.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÍNDICE DE REPARO DE FERIDAS

A Figura 8 mostra o percentual de redução do reparo da ferida. No 3º dia, o grupo que recebeu a membrana de quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5% apresentou redução estatisticamente maior da área lesionada, quando comparado aos grupos controle e quitosana. Após 7 dias, os grupos tratados com quitosana / glicerol 30% e quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5% demonstraram redução significativa na área lesionada comparado ao grupo controle. No 14º dia após o tratamento, pode-se observar que os três grupos que receberam as membranas apresentaram área de

lesão menor quando comparado ao grupo controle.

Figura 8. Índice de reparo de feridas



5.3.3 Análise histológica descritiva

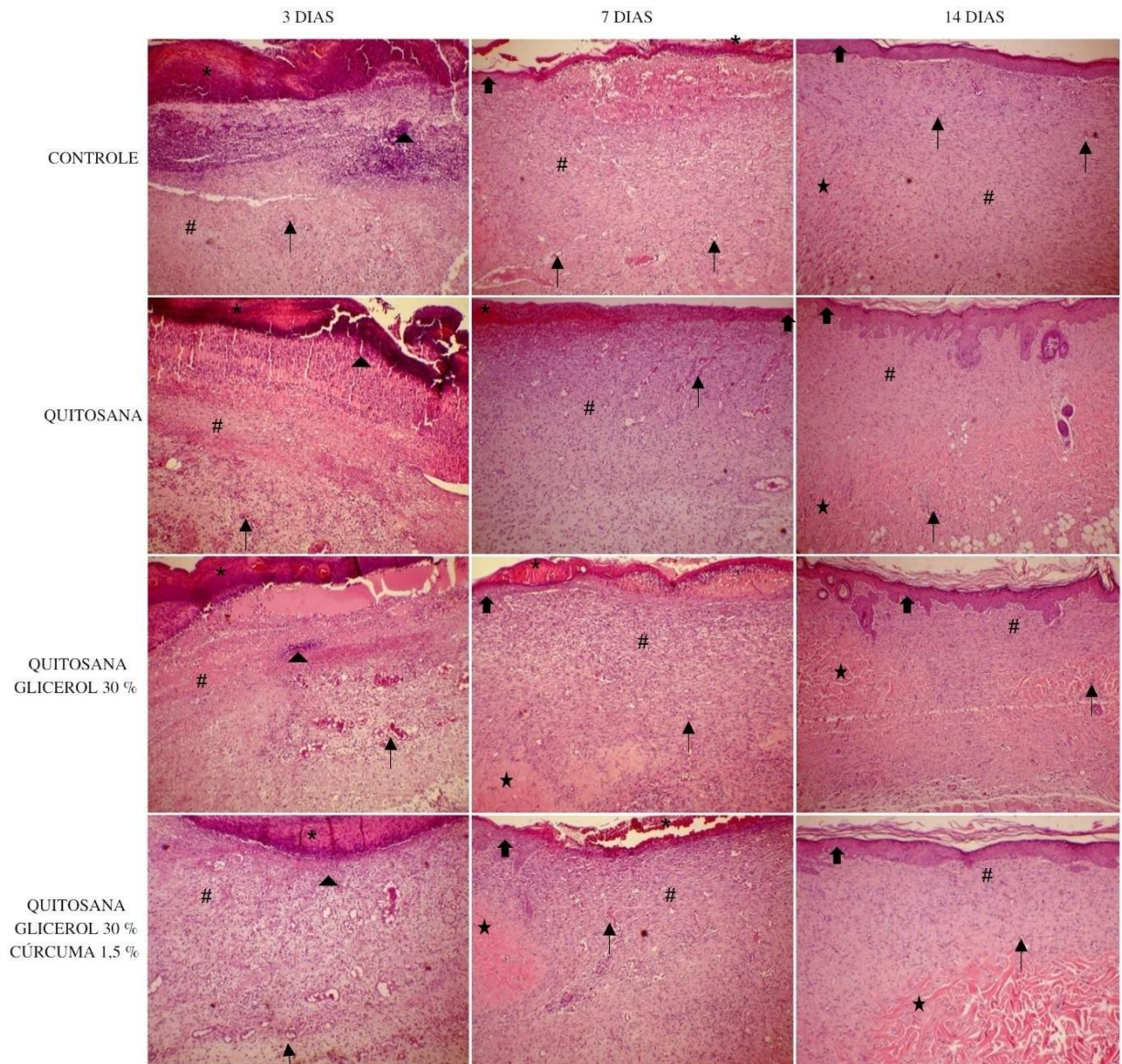
Na análise histológica descritiva (Figura 9), 3 dias após a indução da lesão, no grupo controle foi possível observar a presença de uma espessa crosta cobrindo toda a superfície da lesão, tecido de granulação com intensa presença de células inflamatórias, poucos fibroblastos e angiogênese. No grupo quitosana, observou-se que o processo de reparo estava discretamente melhor que o grupo controle, pois a lesão também estava recoberta por uma crosta e no tecido de granulação havia intenso infiltrado inflamatório, com maior presença de fibroblastos e vasos neoformados. O grupo quitosana/glicerol 30% também apresentou a presença de uma crosta cobrindo a lesão, porém foi possível observar que o infiltrado inflamatório era menor comparado ao grupo controle e quitosana, assim como maior presença de fibroblastos no tecido de granulação e angiogênese. No grupo quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5% havia crosta cobrindo toda a lesão, infiltrado inflamatório leve, moderada presença de fibroblastos e angiogênese no tecido de granulação, que corresponde um melhor processo de reparo comparado aos demais

grupos experimentais.

Após 7 dias, no grupo controle, ainda foi possível observar a presença de uma crosta cobrindo toda a superfície da lesão, células inflamatórias em maior quantidade na região central da ferida, discreto a moderado quantidade de tecido de granulação e angiogênese nas margens da lesão. A reepitelização ocorreu discretamente apenas nas margens da lesão. No grupo quitosana, observou-se que a lesão estava coberta por uma crosta, no tecido de granulação ainda observou-se infiltrado inflamatório, no entanto apresentava maior quantidade de fibroblastos e angiogênese comparado ao grupo controle e a reepitelização estava restrita nas margens da lesão. O grupo quitosana/glicerol 30% também apresentou a presença de uma crosta na região central da lesão, porém foi possível observar que o infiltrado inflamatório era leve, angiogênese moderado e grande quantidade de células fibroblásticas presentes no tecido de granulação e formação de fibras de colágenos nas margens da lesão, apresentado uma área reepitelizada maior em relação aos grupos controle e quitosana. No grupo quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5% de forma semelhante, havia crosta cobrindo a região central da lesão, poucas células inflamatórias, moderado a intenso a presença de fibroblastos e angiogênese no tecido de granulação. Este grupo apresentou maior área reepitelizada e maior deposição de fibras de colágeno.

Após quatorze dias de evolução, não observou a presença de crosta em nenhum grupo experimental. O grupo controle apresentava a reepitelização completa da área de lesão, tecido de granulação com o início de deposição de fibras colágenas nas margens da lesão, no entanto, o tecido neoformado encontra-se em um estágio inferior de reparo comparado aos demais grupos. Nos demais grupos experimentais, a principal diferença é a quantidade e espessura de fibras colágenas, sendo o grupo quitosana/glicerol 30 %/cúrcuma 1,5% com maior deposição de fibras colágenas, seguido pelos grupos quitosana/glicerol 30% e quitosana.

Figura 9. Análise histológica descritiva



Legenda: * = crosta; # = tecido de granulação; ▲ = infiltrado inflamatório; ↑ = vasos sanguíneos; ⬆ = reepitelização; ★ = fibras de colágenos.

6 DISCUSSÃO

Formação e caracterização das membranas

As membranas obtidas tiveram um valor médio de espessura de 46,6 μm , não sendo observado diferença significativa entre a espessura das mesmas. As propriedades mecânicas dos filmes podem sofrer influência da espessura. Segundo Rodríguez et al. (2012), o controle da espessura é muito importante, pois através dela pode-se avaliar a uniformidade e a repetibilidade da medida de suas propriedades e a validade das comparações entre os filmes. Nosso estudo corrobora com o de Antunes et al. (2019) onde a adição do glicerol não influenciou na espessura das membranas. Já Santos et al. (2018) verificaram que a formação de biofilmes comestíveis de carboximetilcelulose contendo cúrcuma longa e nanopartículas de quitosana, levaram a formação de membranas mais espessas em comparação com as membranas de quitosana pura.

Foi possível observar diferença significativa no comportamento mecânico entre as membranas com a adição do glicerol (Figura 3), o que foi confirmado através das medidas de tração e visualização das diferenças no comportamento de tensão e deformação das membranas (Figura 6). Tal comportamento pode ser atribuído ao rompimento das fortes ligações de hidrogênio formadas entre as cadeias de quitosana e a formação de novas ligações hidrogênio entre as cadeias de quitosana e as moléculas de glicerol, que promove maior elasticidade e flexibilidade nas membranas, atuando como plastificantes no processo de formação das membranas. Tais moléculas tem a habilidade de se posicionar entre as cadeias poliméricas da quitosana desfazendo ligações hidrogênio intercadeias do polímero o que faz com que as cadeias da quitosana se afastem, aumentando a flexibilidade (CHEN, M. ET AL., 2018; CARONI ET AL., 2021).

Uma maior flexibilidade para as membranas de quitosana após a inserção de moléculas de glicerol também foi observado no estudo de Caroni (2019), que produziu e caracterizou membranas de quitosana com diferentes concentrações de glicerol, e observou que as diferenças entre as membranas puras de quitosana e membranas plastificadas com glicerol sugerem que as interações entre as cadeias de quitosana e as moléculas de glicerol são fortes o suficiente para confirmar o efeito plastificante na rede polimérica da quitosana. A flexibilidade promovida pelo glicerol em membranas de quitosana é muito interessante para aplicação como curativo. Ainda,

Antunes, et al. (2019), e Chagas et al. (2017), desenvolveram filmes biodegradáveis a base de quitosana e avaliaram o efeito da adição de diferentes concentrações de glicerol. Ambos os estudos concluíram que a adição de concentrações de 10% e 25% de glicerol, conferem aos filmes de quitosana diferentes propriedades, influenciando diretamente suas propriedades mecânicas.

O uso da técnica de FTIR teve como intuito identificar a presença da quitosana, do glicerol e da cúrcuma nas membranas produzidas. Nas membranas de quitosana pura identificamos quatro regiões características: uma referente aos estiramentos N-H e O-H dos grupamentos amino e hidroxila presentes na estrutura do polímero, em que apresenta também a contribuição das interações intermoleculares por ligações de hidrogênio entre as moléculas de quitosana; as bandas que correspondem aos estiramentos assimétricos e simétricos da ligação C-H; a banda atribuída à amida I, que corresponde ao estiramento da carbonila (C=O) e a banda proveniente do estiramento N-H, que é conhecido como amida II. Já o espectro para as membranas contendo glicerol, evidenciam duas principais regiões, atribuída ao grupo -OH e os picos referentes aos estiramentos C-H (CERQUEIRA et al., 2012). Também se observa bandas de absorção típicas do glicerol, correspondentes as vibrações das ligações C-C e C-O e as que são referentes a torção -CH (GUERRERO et al., 2010).

Assim como nossa pesquisa, Furtado et al. (2016) não observou mudanças significativas nos espectros FTIR com a adição do glicerol, uma vez que os plastificantes se caracterizam por manterem a estrutura química do polímero, ou seja, não houve formação de ligações químicas com a adição do glicerol.

A análise de FTIR também foi realizada com intuito de identificar possíveis interações entre essas substâncias. Além do aumento na intensidade das bandas atribuídas à deformação OH (centradas em 3346 cm^{-1} e 3258 cm^{-1}) e aquelas atribuídas às cadeias alquílicas (centradas em 2923 cm^{-1} e 2875 cm^{-1}) com a adição de glicerol, nenhuma banda nova ou grandes deslocamentos nos números de onda das bandas foi observada no nosso estudo.

Diferentemente do nosso estudo onde não se evidenciou nenhuma banda correspondente a cúrcuma, Furtado (2014) utilizando concentração de 1,2 mg/ml de cúrcuma em relação a massa da quitosana na produção das membranas mistas, identificou uma pequena redução de intensidade nas bandas centradas em 3264 a 2918, 1557 e 1377 cm^{-1} . Estas reduções foram atribuídas a uma possível interação

entre os grupos amina da quitosana e os grupos cetona da curcumina (BORUAH, SAIKIA e DUTTA, 2012).

Assim como Junior (2020) que observou um pequeno aumento na intensidade das bandas referentes aos grupos metil e metileno ($2970\text{--}2868\text{ cm}^{-1}$) nas membras mistas de quitosana e cúrcuma, em comparação a de quitosana pura, bem como o surgimento de um pequeno ombro próximo a 1108 cm^{-1} que está relacionado ao estiramento C–O das ligações éteres. Porém essas observações só foram possíveis quando analisadas as membranas do lado de baixo. Diferentemente do nosso estudo as membras desta pesquisa, se mostraram heterogêneas e espessas.

Dependendo da polaridade do líquido usado na medida do ângulo de contato e dos polímeros que formam os filmes, é determinado o grau de hidrofiliidade ou hidrofobicidade do material. Segundo nossos resultados, a membrana formada apenas por quitosana apresenta valor de ângulo de contato médio de 104° , indicando característica hidrofóbicas, apesar da presença dos grupos amina e hidroxila (grupos polares) da quitosana. No estudo de Junior (2020), corroborando nossos resultados, as membranas de quitosana obtiveram um ângulo de contato acima de 100° . Já para as membranas de quitosana/glicerol 30% e quitosana/glicerol 30%/ cúrcuma 1,5%, os valores de ângulo de contato médio foram 88° e 85° , respectivamente, lhes dando características hidrofílicas. Na realização dos experimentos, conforme a água era gotejada na superfície das membranas uma pequena deformação na superfície do material foi observada (possível absorção de água), sugerindo forte interação entre os materiais.

Em oposição ao observado nos nossos resultados, Chen et al. e Caroni et al. desenvolveram membranas formadas por quitosana e glicerol onde a adição de glicerol levou a um aumento no ângulo de contato dos materiais com a água e, conseqüentemente, um aumento na hidrofobicidade. Uma possível explicação para esse comportamento foi dada pelos autores, mostrando que as cadeias de quitosana são eficientemente plastificadas pela inserção das moléculas de glicerol, por possibilitarem a formação preferencial de um sítio único para ligações hidrogênio. Como consequência, as interações intercadeia da quitosana são quebradas e os grupos hidrofóbicos do glicerol (C-H) tornam-se expostos (grupos apolares). Já no trabalho de Caroni et al., os autores sugerem que as membranas plastificadas com glicerol impedem a desidratação do ambiente (retém umidade), uma vez que a polaridade dos grupos hidroxila podem melhorar a adsorção em ambientes úmidos

(ambiente de feridas) e a natureza hidrofóbica dos grupos alquila (C-H) evita o excesso de umidade nas feridas, promovendo adicional proteção contra a proliferação de micro-organismos.

Assim como em nossa pesquisa, estudos realizados por Santos et al. (2018) mostraram que ao avaliar e caracterizar biofilme comestível de carboximetilcelulose contendo cúrcuma longa e nanopartículas de quitosana, observou-se que as membranas que continham cúrcuma mantiveram características hidrofílicas, com valores de ângulo de contato abaixo de 90° . Esse comportamento ocorre porque a cúrcuma apresenta em sua estrutura química grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, sendo constituída por uma longa cadeia carbônica com oxigênios nas extremidades que lhe confere característica lipofílica. A cúrcuma é uma substância lipofílica (apresenta afinidade por compostos lipídicos), e mesmo em pequena quantidade na composição dos filmes corrobora com a repulsão ou atração do biofilme com a água. Característica essa interessante quando se trata de curativos, uma vez que no processo de reparação se faz necessário um ambiente nem tanto hidrofóbico, nem muito hidrofílico.

Valores de tensão, módulo de elasticidade, alongação, entre outros, servem de base para comparação do desempenho mecânico dos materiais, incluindo os materiais poliméricos. A tensão de ruptura é a última tensão suportada pelo material antes do rompimento/quebra. É definida como a força máxima necessária para que o filme deforme. Observa-se, pelos resultados obtidos, que o valor desta propriedade foi inversamente proporcional quando se utilizou plastificante.

Na nossa pesquisa podemos observar que as membranas puras de quitosana, suportaram uma força de tração significativamente maior, antes da sua ruptura. Porém, apesar de mais resistentes a tração, as mesmas se apresentam quebradiças, com pequena deformação plástica (baixa elasticidade). Já as membranas que contém glicerol, suportam menor força de tração antes da deformação plástica, porém, são mais elásticas apresentando região de deformação plástica maior, em comparação a membrana de quitosana pura. Tal fato pode ser relacionado ao efeito plastificante do glicerol nas cadeias poliméricas da quitosana.

Foram analisados também o módulo de elasticidade, conhecido como módulo de *Young*, que é um indicativo da rigidez do filme relacionando a tensão e a deformação na região elástica do material, na qual a resposta do filme à deformação é crescente e linearmente proporcional à tração a qual é submetido. Podemos

observar que a adição da cúrcuma, tornou as membranas mais rígidas, aumentando seu módulo de elasticidade, que ficou em $1,42 \times 10^{-3}$ MPa. Diferente do encontrado por Schaefer et al. (2018) onde a inserção da cúrcuma nos filmes não alterou os valores de tensão, alongação na ruptura e módulo elástico dos filmes.

Embora mais rígida, a membrana contendo cúrcuma possui grande região de deformação plástica, como observado na Figura 6, gráfico B, demonstrando maior elasticidade dessa membrana em comparação com a membrana de quitosana pura. Corroborando nossos resultados, Santos et al. (2018) mostraram que ao analisar biofilmes formados por cúrcuma longa, carboximetilcelulose (CMC) e nanopartículas de quitosana, observou-se que ao adicionar as nanopartículas de quitosana e a cúrcuma, ocorreu um aumento considerável no valor de alongação do biofilme. Destaca-se que a grande variabilidade nos ensaios de tração acaba dificultando a comparação direta dos dados obtidos no nosso trabalho com os disponíveis na literatura.

Testes *in vivo*

Os parâmetros macroscópicos e a análise morfométrica aqui estudados permitiram verificar a evolução das feridas, sinais de inflamação e infecção, bem como a redução da ferida. Não foi observado nenhum caso de necrose, intensa reação inflamatória, exsudato purulento ou abscessos em nenhum grupo tratado. Assim como no estudo de Batista et al (2015), que não observou presença de pus em nenhum grupo e nem reação inflamatória severa. Esses dados sugerem que a quitosana assim como a cúrcuma, podem permitir a drenagem da ferida, sem favorecer o ressecamento da área coberta, dois dos principais fatores que comprometem a cicatrização. No presente estudo, não observamos reações de sensibilidade à membrana, como edema, rubor, dor, ou coceira, confirmando a segurança clínica para seu uso em feridas. De maneira semelhante, nos estudos de Souza et al. (2016) e de Moreira et al. (2018) ambos as membranas/materiais desenvolvidos se mostraram seguros.

Conforme apresentado na Figura 7, observou-se qualitativamente a evolução da cicatrização ao longo do tempo de tratamento. Para 3 dias de tratamento a fase inflamatória, uma região avermelhada foi observada no local da ferida, com maior intensidade no grupo controle, assim como a formação de uma crosta inicial foi

observada em todos os grupos. Com 7 dias de tratamento a primeira crosta já estava desaparecendo e já era possível observar a contração da ferida em todos os grupos experimentais. Não houve sinal de infecção durante o tratamento em nenhum dos grupos. Aos 14 dias de tratamento os grupos em que se utilizou as membranas apresentaram características semelhantes, com contração quase que completa da ferida, sendo que o grupo controle, apresentava ainda alguns resquícios de crosta, sendo ainda possível observar o local da incisão, diferentemente dos demais grupos.

Diferentemente dos nossos achados, o estudo de Batista, et al (2015) que avaliou a atividade cicatrizante do extrato etanólico da casca do caule de *L. divaricata* acrescido de gel de quitosana, observou que animais do grupo quitosana apresentaram uma cicatrização mais lenta, pois nestes, o exsudato persistiu até o 7º dia de tratamento. O exsudato é normal durante as primeiras 48 a 72 horas, de modo que, quando o exsudato persiste, há uma desagregação da crosta, podendo favorecer o desenvolvimento de micro-organismos entre ela e o tecido de granulação.

Já Santos et al. (2016) ao analisar a cicatrização de feridas utilizando spray de quitosana, pode observar superioridade dos tratamentos à base de quitosana em comparação com o uso de solução fisiológica. Nesse estudo, a quitosana teve maior efetividade nos quatro primeiros dias pós-operatório, corroborando com nossos achados. Segundo o autor, o hidrogel de quitosana tem a capacidade de otimizar a contração e cicatrização da ferida por atuar como um curativo oclusivo que possibilita a permeabilidade de exsudatos.

A diminuição da área lesionada ocorreu devido ao mecanismo de contração e do movimento centrípeto dos limites da ferida em direção ao centro da ferida, com o objetivo de diminuir a área a ser recoberta pelo epitélio em proliferação, caracterizando a cicatrização por segunda intenção (Batista et al., 2015). Ao analisar o percentual de contração da ferida, conforme mostra a Figura 8, no dia 3 o grupo tratado com membranas formadas por quitosana/glicerol/cúrcuma apresentou maior redução da ferida, chegando a quase 50%. Já com 7 dias, tanto o grupo tratado com quitosana/glicerol/cúrcuma quanto o grupo quitosana/glicerol apresentaram percentual maior de contração da ferida em comparação com os demais grupos, obtendo quase 90% de fechamento. Todos os grupos tratados apresentaram melhores resultados do que o grupo controle ao final do tratamento com 14 dias. Corroborando com nosso estudo, Gurgel et al. (2008) também observou melhores

resultados nos grupos tratados com quitosana em comparação com os demais grupos. E semelhantemente, com os melhores resultados vistos após 3 dias.

Nossos achados de reparação tecidual utilizando cúrcuma corroboram com Grigolli e Poletti et al. (2010) que observaram significativa contração da ferida, chegando a menos 1,5 cm no tamanho inicial, quando utilizaram tratamento baseado com gel não-iónico contendo extrato glicólico da *Curcuma longa* L. a 3%. Corroboram ainda com os achados de Ferreira et al. (2021) que avaliou o efeito terapêutico do uso combinado de biomembrana de látex natural (BLN) contendo curcumina e LEDterapia em portadores de pé diabético. Os resultados mostram que o grupo experimental que fez o tratamento com LED associado à BLN contendo curcumina, apresentou uma cicatrização média de 70%, enquanto o outro grupo, que recebeu tratamento com LED e BLN sem curcumina, o percentual de cicatrização em média foi de 46%, demonstrando a influência positiva da curcumina na reparação tecidual.

Em outro estudo, Krausz et al. (2015), encapsularam curcumina em nanopartículas com poli-L-lisina e testaram seu potencial antimicrobiano *in vitro* e *in vivo* em modelo animal de ferida nos ratos. A curcumina *in natura* tem baixa estabilidade em meio aquoso, porém, possui inata capacidade antimicrobiana e cicatrizante. Os autores afirmam que através de sua formulação em nanocápsulas foi possível obter melhor estabilidade. Através dos testes *in vivo* foi observado favorecimento na proliferação de colágeno, neovascularização e redução do tempo de cicatrização. Estudos como o de Li et al. (2012), também comprovaram o potencial cicatrizante da curcumina em associação com nanoformulação de quitosana. Nesse estudo o fechamento da ferida no grupo controle foi de aproximadamente 62% no dia 3 do pós-ferimento, e de 80% no mesmo dia no grupo que utilizou o filme com a quitosana associada a cúrcuma.

Na avaliação da formação crostosa no 3º e 7º dia, os grupos tratados apresentaram formação moderada de crosta, enquanto o grupo controle apresentou crostas com formação moderada à intensa (Figura 9). No 14º dia as crostas já se apresentavam ausentes em todas as feridas de todos os grupos. O grupo quitosana/glicerol30%/cúrcuma 1,5% foi o que apresentou melhor eficácia no processo de reparo tecidual, apresentando moderada presença de fibroblastos e angiogênese no tecido de granulação já no 3º dia, além de apenas um leve infiltrado inflamatório.

A inflamação é uma fase importante da cicatrização de feridas, muitas vezes descrito como primeiro passo para uma reparação ideal da pele, porém, respostas inflamatórias não controladas podem levar a efeitos indesejáveis e subsequentemente danos aos tecidos (AKBIK et al., 2014). Nossos resultados demonstraram uma ação anti-inflamatória importante da quitosana e da cúrcuma no 3º e 7º dia, com diminuição do número de células inflamatórias progressivamente, sendo que o grupo quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5% apresentou os menores números de células inflamatórias, corroborando com os achados de D'EMERY et al. (2020).

A angiogênese é fundamental para os processos de cura de tecidos, pois auxilia no transporte de oxigênio e no transporte de células. Os fatores de crescimento e outros mediadores estimulam as células endoteliais dos vasos intactos dentro das margens da ferida, a migrarem para a área lesada, diferenciando-se para formar novos capilares que brotam no lado externo dos vasos. Estes juntam-se aos capilares originais e restauram o fluxo sanguíneo (BALBINO et al., 2005). Foi possível observar a formação de novos vasos em todos os grupos experimentais. Assim como no estudo de Santos et al. (2016), no qual o parâmetro neovascularização permaneceu estatisticamente semelhante entre os três grupos analisados, sendo eles: grupo controle, grupo gel de quitosana 2% e grupo spray de quitosana.

Quanto a presença de fibroblastos no tecido de granulação, foi possível observar que o grupo quitosana/glicerol 30%/cúrcuma 1,5% apresentaram os melhores resultados. Já no 3º dia havia moderado quantidade, no 7º dia a presença de fibroblastos foi considerada moderado a intenso com maior deposição de fibras de colágeno, que se intensificaram no 14º dia, com modificação na sua espessura. Nossos achados corroboram com o estudo de LENG et al., (2020), bem como com o de Song, et al., (2019), onde foi observado uma reepitelização mais rápida da ferida e um aparente aumento da deposição de colágeno nos grupos tratados com quitosana.

A quitosana, por meio da despolimerização gradativa, libera N-acetil- β -D-glucosamina, que estimula a proliferação de fibroblastos e a síntese de ácido hialurônico, além de contribuir na ordenação das fibras de colágeno. Ademais, evidencia-se o estímulo à produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α), que é um importante regulador da matriz extracelular, pois inibe a síntese de proteases, estimula a produção de seus inibidores e, reforça a fibroplasia e a deposição de colágeno (SANTOS, 2016)

Durante o processo de reparação tecidual, os fibroblastos participam ativamente na formação do tecido de granulação, produzindo proteínas estruturais, como colágeno do tipo I e III e elastina. A formação das fibras de colágeno puderam ser observadas no 7º dia nos grupos quitosana/glicerol e quitosana/glicerol/cúrcuma, sendo que no grupo controle e quitosana só foi possível observar no 14º dia. Nossa pesquisa corrobora com os achados de Silva et al. (2015) que analisou o processo de reparo cicatricial de úlceras bucais tratadas com oleoresina de cúrcuma e identificou o aumento nas fibras de colágeno nos grupos tratados com cúrcuma.

A formação e deposição do colágeno configura etapa fundamental durante o processo de reparo de feridas. O colágeno é uma proteína fibrosa cuja síntese pelos fibroblastos depende de oxigênio, hidroxilação da prolina e lisina, ferro, vitaminas A, C e E, tiroxina, proteínas e zinco. É considerado a principal responsável pela sustentação e força tênsil da cicatriz (TAZIMA *et al.*, 2008).

De forma geral, a utilização da quitosana e da cúrcuma atuou favoravelmente durante o processo de reparação de feridas induzidas cirurgicamente em ratos, sendo que a membrana que continha cúrcuma a mais eficaz para o tratamento, favorecendo mais rapidamente o reparo. No entanto, mais estudos são necessários para validar os efeitos observados, utilizando inclusive diferentes concentrações do pigmento cúrcuma e métodos quantitativos de análise dos testes *in vivo*.

7 CONCLUSÕES

Apesar de existir no mercado inúmeros itens destinados ao auxílio da reparação tecidual, estes ainda detêm algumas desvantagens, dentre elas o alto custo. Neste contexto, a quitosana e a cúrcuma surgem como materiais promissores, visto que apresentam características desejáveis para a composição de materiais destinadas à substituição temporária do tecido tegumentar. Ainda que diferentes formulações à base de quitosana e/ou cúrcuma tenham sido testadas, pela primeira vez foi realizado um estudo *in vivo*, para avaliar a efetividade da combinação destes na cicatrização de pele. Assim, membranas sustentáveis e homogêneas de quitosana, quitosana/glicerol e quitosana/glicerol/cúrcuma foram produzidas e caracterizadas. As membranas, com espessura variando de 40 a 55 ± 10 μm foram obtidas utilizando a técnica *casting* de formação de filmes. A adição do glicerol nas membranas de quitosana levou ao aumento na flexibilidade e na hidrofiliabilidade. Já a adição de cúrcuma levou a formação de membrana mais rígida (maior módulo de elasticidade) do que a membrana de quitosana pura que, por sua vez, é mais rígida do que a membrana plastificada com glicerol 30%. Porém, embora rígida, a membrana contendo cúrcuma possui grande região de deformação plástica, demonstrando maior elasticidade em comparação com a membrana formada por quitosana pura. A maior hidrofiliabilidade observada nos valores de ângulo de contato das membranas contendo glicerol e cúrcuma, em comparação as membranas de quitosana pura, corroboram o visto no momento na aplicação das membranas nos animais, onde foi percebido maior adesão ao ferimento das membranas mais hidrofílicas. Nos experimentos *in vivo*, não foi observado nenhum sinal de rejeição ao curativo. Os resultados das análises microscópicas e morfométricas indicam que o grupo tratado com a membrana composta por quitosana/glicerol/cúrcuma mostrou os melhores resultados, com maior contração da ferida já no terceiro dia, redução progressiva e significativa do número de células inflamatórias, aumento no número de fibroblastos e na formação de novos vasos, e na deposição e modificação de colágeno, fatores esses que contribuíram para a reparação da lesão de forma mais rápida. Tal característica é importante visando o desenvolvimento de curativos. A realização de novos estudos é imprescindível para o melhor entendimento das respostas obtidas com o uso de tal material, como também para o desenvolvimento de outros produtos confeccionados a partir da quitosana e da cúrcuma com a finalidade de reparação de feridas.

REFERÊNCIAS

- ANTOINE, F.; GIRARD, D. Curcumin increases gelatinase activity in human neutrophils by a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-independent mechanism. **J Immunotoxicol**, v. 12, n. 2, p. 188-193, abr./jun., 2015.
- ANTUNES, L.B., Effect of glycerol on the mechanical properties of films the based on chitosan. **Revista Desafios** – v. 6, Especial, 2019.
- AKBIK, Dania; GHADIRI, Maliheh; CHRZANOWSKI, Wojciech; ROHANIZADEH, Rohanizadeh. Curcumin as a wound healing agent. **Life Sciences**, v.116, n.1, p.1-7, 2014.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.1, p.27-51, 2005.
- BANO, I. et al. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. **Int J Biol Macromol**, v. 102, p. 380-383, 2017.
- BARBUL A. 2006. History of wounds healing, p.25-78. In: Brunicardi F.C., Seymour I., Schwarts D.L., Dun D.K. & Andersen R.E. **Schwartz's Surgery**. Companion handbook, Ontario
- BARCHITTA, M. et al. Nutrition and wound healing: An overview focusing on the beneficial effects of curcumin. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 5, 1119, 2019.
- BATISTA, E.K.F. et al., Macroscopic assessment of healing activity plan *Luehea divaricata* (flog-horse) in therapeutic topical skin wound. **Archives of Veterinary Science**. v.20, n.4, p.26-35, 2015.
- BIRANJE, S.S. et al. Hemostasis and anti-necrotic activity of wound-healing dressing containing chitosan nanoparticles. **Int J Biol Macromol**, v. 121, p. 936-946, 2019.
- BORGES, J. C. A. et. al. Ação Antioxidante da curcumina (curcuma longa l.) na injúria de isquemia e reperfusão tecidual. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.16 n.29; p. 2019
- BORUAH B.; SAIKIA M. P.; DUTTA R. K. Binding and stabilization of curcumin by mixed chitosan–surfactant systems: A spectroscopic study. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 245, p. 18– 27, 2012.
- BRITO, Ticiania Sant'Anna. **Tratamento de queimados graves com transplante de pele homóloga: revisão sistemática**, Monografia apresentada no Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia, da Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2016.

BRUGNEROTTO, J. et al. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Rev. Polymer**, Amsterdã, v.42, n.2001, p. 3569-3580, Sep. 2000

CARONI, J.C. et al., Chitosan-based glycerol-plasticized membranes: bactericidal and fibroblast cellular growth properties. **Polymer Bulletin** (2021) 78:4297–4312.

CERQUEIRA, Miguel A. et al. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films - **A comparative study. Food Hydrocolloids**, 2012.

Chen M, et al. Hydrogen bonding impact on chitosan plasticization. **Carbohydr Polym**, 200, 115-121, 2018.

CUNHA, J.L.S. et al. Effects of different protocols of low-level laser therapy on collagen deposition in wound healing. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 4, p. 317-324, 2019.

Dário G.M. 2008. **Avaliação da atividade cicatrizante de formulação contendo argila medicinal sobre feridas cutâneas em ratos**. Dissertação de mestrado, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma

DEUS, W.F. de et al. Curcuminoid-tailored interfacial free energy of hydrophobic fibers for enhanced biological properties. **ACS Appl. Mat. Interfaces**. 13, 2449324504, 2021.

D'EMERY, M.B., **Avaliação do óleo essencial das folhas de cúrcuma longa na cicatrização de feridas cutâneas de ratos**. Tese apresentada ao programa de Mestrado em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2020.

ESTEVÃO, L., CASSINI-VIEIRA, P., LEITE, A. G., BULHÕES, A., BARCELOS, L. DA, & EVÊNCIO-NETO, J. (2019). Morphological Evaluation of Wound Healing Events in the Excisional Wound Healing Model in Rats. **BIO-PROTOCOL**, 9(13). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3285>

FARIA, R.F., **Efeito da suplementação crônica de curcuma longa I. sobre marcadores de inflamação e dano muscular após uma meia maratona**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2016.

FARIAS, E.T.N., **Avaliação Fitoquímica, Toxicológica, Cicatrizante e Antimicrobiana de Frutos e sementes de *caesalpinia ferrea mart.* (Leguminosae)**. Tese apresentado ao departamento de Doutorado em Biociência animal da Universidade federal Rural de Pernambuco. Recife, 2017.

FARHOOD, B. et al. Curcumin as an anti-inflammatory agent: Implications to radiotherapy and chemotherapy. **J Cell Physiol**, v. 234, n. 5, p. 5728-5740, 2019.

FERREIRA, L.S., **Efeito terapêutico do uso combinado de biomembrana de látex natural contendo curcumina e ledterapia (dispositivo terapêutico rapha®) em portadores de úlcera diabética.** Dissertação apresentada ao programa de Mestrado em Engenharia Biomédica da Faculdade de Brasília, Brasília-DF, 2021.

FEREYDOUNI, N. et al. Curcumin nanofibers for the purpose of wound healing. **J Cell Physiol**, v. 234, n. 5, p. 5537-5554, 2019.

FRÁGUAS, R.M. et al. Caracterização química e efeito cicatrizante de quitosana, com baixos valores de massa molar e grau de acetilação, em lesões cutâneas. **Polímeros**, v. 25, n. 2, p. 205-211, 2015.

FURTADO, G.T.F.S., **Quitosana/curcumina: membranas de liberação controlada para tratamento de melanoma.** Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2014.

FURTADO, L.M., **Influência do glicerol em membranas de quitosana.** Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Química Bacharelado da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2016.

GRIGOLLI, B.F.; POLETTI, N.A.A., Estudo clínico da utilização de um creme de Cúrcuma longa I. para a cicatrização de úlceras por pressão. **Arquivos de Ciências da Saúde**, Vol. 17, Supl. 1, 2010.

GUERRERO, P. et al. Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 1, p. 145–151, 2010.

GUPTA, A; RATTAN, V; RAI, S. Efficacy of Chitosan in promoting wound healing in extraction socket: A prospective study. **J Oral Biol Craniofac Res**, v. 9, n. 1, p. 9195, 2019.

GURGEL, R.A.S., **Avaliação da ação da quitosana em orabase na reparação tecidual quando associado ou não ao laser visível de 660nm.** Tese apresentada ao programa de doutorado em odontologia da Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2008.

HASSAINIA, A.; SATHA, H.; BOUFI, S. Chitin from *Agaricus bisporus*: extraction and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p.1334–1342, 2018.

ISSAC, C. et al, Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica, **Rev Med (São Paulo)**. 2010 jul.-dez.;89(3/4):125-31. 2010

JUNIOR, A.E., **Desenvolvimento de fibras eletrofiadas de acetato de celulose recobertas com quitosana contendo curcumina aplicadas em tratamentos cutâneos.** Tese apresentada ao programa de doutorado em química da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2020.

JUNQUEIRA; CARNEIRO, **Histologia Básica Texto & Atlas. 13^a ed.**

KIM, S. Competitive biological activities of chitosan and its derivatives: antimicrobial, antioxidant, anticancer, and anti-inflammatory activities. **Int J Polymer Sci**, 2018.

KRAUSZ, A. E. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. Nanomedicine: Nanotechnology, **Biology, and Medicine**, v. 11, p. 195-206, 2015.

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

KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. ROBBINS E COTRAN – Patologia: bases patológicas das doenças. 7a ed. **Elsevier**, Rio de Janeiro, 2005.

LAW, K. Definitions for Hydrophilicity, Hydrophobicity, and Superhydrophobicity: Getting the Basics Right. **J. Phys. Chem**, v.5, n.4, p.686-688, Feb. 2014.

LENG, Q.Q. et al. Curcumin nanoparticles incorporated in PVA/collagen composite films promote wound healing. **Drug delivery**, v. 27, n. 1, p. 1676-1685, 2020.

LI, H.Y. et al. Curcumin inhibits angiotensin II-induced inflammation and proliferation of rat vascular smooth muscle cells by elevating PPAR- γ activity and reducing oxidative stress. **Int J Mol Med**, v. 39, n. 5, p. 1307-1316, 2017.

LI, X. et al. In vivo evaluation of curcumin nanoformulation loaded methoxy poly(ethyleneglycol)-graft-chitosan composite film for wound healing application. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 84-90, 2012.

LI, Y. et al. Antiviral and virucidal effects of curcumin on transmissible gastroenteritis virus in vitro. **J Gen Virol**, v. 101, p. 1079-1084, 2020.

LIAO, F. et al. Curcumin enhances anti-tumor immune response in tongue squamous cell carcinoma. **Arch Oral Biol**, v. 92, p. 32-37, 2018.

LICZBINSKI, P.; MICHAŁOWICZ, J.; BUKOWSKA, B. Molecular mechanism of curcumin action in signaling pathways: Review of the latest research. **Phytother Res**, v. 34, n. 8, p. 1992-2005, 2020.

Lima R.O.L., Rabelo E.R., Moura V.M.B.D., Silva L.A.F., Tresvenzol L.M.F. Cicatrização de feridas cutâneas e métodos de avaliação. Revisão de literatura. **Revista CFMV**. Ano XVIII. 56:53-59. 2012

LIU, H. et al. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. **RSC Adv.**, v. 8, p. 7533-7549, 2018.

Ma Y. et al. Materials science & engineering C Chitosan membrane dressings

toughened by glycerol to load antibacterial drugs for wound healing. **Mater Sci Eng C**, 81, 522–531, 2017.

MASOOD, M. et al. Silver nanoparticle impregnated chitosan-PEG hydrogel enhances wound healing in diabetes induced rabbits. **Int J Pharm**, v. 559, p. 23-26, 2019.

MATICA, M.A. et al. Chitosan as a wound dressing starting material: antimicrobial properties and mode of action. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 23, 5668, 2019.

MENDES, S. S. **Desenvolvimento de Membranas Assimétricas Eletrofiadas para Regeneração da Pele**. Dissertação Mestrado em Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade. Coimbra, 2017.

MIRZAHOSSEINIPOUR, M. et al. Antimicrobial photodynamic and wound healing activity of curcumin encapsulated in silica nanoparticles. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 29, 101639, 2020.

MOEINI, A. et al. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. **Carbohydrate Polymer**, v. 233, 115839, 2020.

MORGANTI, P.; COLTELLI, M.B. A new carrier for advanced cosmeceuticals. **Cosmetics**, v. 6, 10, 2019.

MUXICA, A. et al. Chitosan as a bioactive polymer: processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.105, p. 1358–1368, 2017.

NASCIMENTO, P.R.S., JUNIOR, E.L.S., BRANCO, A.C.S.C. Pharmacological applications of *Cúrcuma longa* L. as medicinal plant: A review. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, e2629108430, 2020

NAVEED, M. et al. Chitosan oligosaccharide (COS): An overview. **Int J Biol Macromol**, v. 129, p. 827-843, 2019.

NGUYEN, M.H. et al. *In vivo* comparison of wound healing and scar treatment effect between curcumin-oligochitosan nanoparticle complex and oligochitosan-coated curcumin-loaded-liposome. **J Microencapsul**, v. 36, n. 2, p. 156-168, 2019.

NIRANJAN, R. et al. Enhanced wound healing by PVA/Chitosan/Curcumin patches: In vitro and in vivo study. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 182, 110339, 2019.

OHNISHI, Y. et al. Curcumin inhibits epithelial-mesenchymal transition in oral cancer cells via c-Met blockade. **Oncol Lett**, v. 19, n. 6, p. 4177-4182, 2020.

OLIBERS' paradox has more to teach. **Nature**, London, v. 349, n. 31, jan. 1949

OLIVEIRA, I.V.P.M.; DIAS, R.V.C. Wound healing: stages and influencing factors. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.267-271, 2012

Paganela J.C., et al., Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. **RPCV**. 104(569-572):13-18. 2009.

PARK, J.U. et al. Acceleration of the healing process of full-thickness wounds using hydrophilic chitosan-silica hybrid sponge in a porcine model. **J Biomater Appl**, v. 32, n. 8, p. 1011-1023, 2018.

PATRULEA, V. et al. Chitosan as a starting material for wound healing applications. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 97, n. Pt B, p. 417-426, 2015.

RODRIGUES, B.F.F.S., **Engenharia de tecidos para regeneração da pele: retrospectiva e perspectivas futuras**. Tese de mestrado apresentado ao curso de Ciências Farmacêuticas na Faculdade de Ciências da saúde da Universidade Fernando Pessoa, Porto-2012.

RODRÍGUEZ, F. J.; GALOTTO, M. J.; GUARDA, A.; BRUNA, J. E. Modification of cellulose acetate films using nanofillers based organoclays. **Journal of Food Engineering**, London, v. 110, p. 262-268, 2012.

SAHANA, T.G.; REKHA, P.D. Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. **Mol Biol Rep**, v. 45, n. 6, p. 2857-2867, 2018.

SANTOS, T.C.C., **Spray de quitosana na cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos**. Tese apresentada ao programa de mestrado em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2016.

SANTOS, V.S., **Avaliações e caracterizações de biofilme comestível de carboximetilcelulose contendo cúrcuma longa e nanopartículas de quitosana**. Tese apresentada ao programa de mestrado em Ciência dos Materiais da Faculdade de Engenharia na Universidade Estadual Paulista "JÚLIO DE MESQUITA FILHO", Ilha Solteira, 2018.

SCHAEFER, E.W., **Desenvolvimento de filmes à base de quitosana e amido de milho incorporados com cúrcuma**. Tese apresentada ao departamento de engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2018.

SILVA, J.B., **Análise histopatológica do processo de reparo cicatricial de úlceras bucais tratadas com oleoresina de cúrcuma (curcuma longa L.): estudo em ratos**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco. Vitória de Santo Antão, 2015.

SONG, R. et al. A natural cordycepin/chitosan complex hydrogel with outstanding self-healable and wound healing properties. **Int J Biol Macromol**, v. 1, n. 134, p. 9199, 2019.

SONG, Z. et al. Dietary curcumin intervention targets mouse white adipose tissue inflammation and brown adipose tissue UCP1 expression. **Obesity (Silver Spring)**, v. 26, n. 3, p. 547-558, 2018.

SOUSA, P.G., CASTRO, M.S., SILVA, L.P. A Biologia da proliferação fibroblástica: a excessiva deposição extracelular de colágeno durante o reparo de lesões na pele. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.3, p. 28989-29010 mar 2021.

SRIROD, S.; TEWTRAKUL, S. Anti-inflammatory and wound healing effects of cream containing Curcuma mangga extract. **J Ethnopharmacol**, v. 238, 111828, 2019.

Szwed, D. N.,; SANTOS, V. L. P. GROWTH FACTORS INVOLVED IN SKIN HEALING. **Cad. da Esc. de Saúde**, Curitiba, V.1 N.15: 7-17.

TABOSA, A.S.A., SANTOSI.M.S. SIQUEIRA, L.P. Anti-inflammatory action of the long turmeric extract (earth saffron) in the treatment of radiodermatitis - a literature review. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n.12, p. 94970-94985, dec. 2020

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

TANG, W. et al. Therapeutic effect of curcumin on oral diseases: A literature review. **Phytother Res**, p. 1-9, 2020.

TRIPLETT, R.G.; BUDINSKAYA, O. New frontiers in biomaterials. **Oral Maxillofacial Surg Clin N Am**, v. 29, p. 105-115, 2017.

TYAGI, P. et al. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. **PLoS One**, v. 10, n. 3, e0121313, 2015.

WANG, J. et al. Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 β transgenic mice subjected to the lipopolysaccharide-induced sepsis. **Biomaterials**, v. 53, p. 475-83, 2015.

WANG, L. et al. Chitosan-alginate PEC membrane as wound dressing: Assessment of incisional wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.63, p.610-618, 2002.

WATHONI, N. et al. Enhancement of curcumin wound healing ability by complexation with 2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrin in sacran hydrogel film. **Int J Biol Macromol**, v. 98, p. 268-276, 2017.

XU, R. et al. Novel bilayer wound dressing composed of silicone rubber with particular micropores enhanced wound re-epithelialization and contraction. **Biomaterials**, v. 40, p. 1-11, 2015.

ZHANG, Y. et al. New MD2 inhibitors derived from curcumin with improved antiinflammatory activity. **Eur J Med Chem**, v. 148, p. 291-305, 2018.

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 E UTILIZAÇÃO DE MEMBRANAS À BASE DE QUITOSANA E CURCUMINA NO PROCESSO DE REPARO DE FERIDAS”. Protocolo número 017987/2021-10, sob responsabilidade de *Antonio 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**, 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 ISOGÊNICO	WISTAR	MACHO	2 MESES	250 G	01 ANO	40

TERESINA, 09 DE DEZEMBRO DE 2021


Dr. Francisco Araújo
 Sub-Coordenador CEUA/UESPI
 Portaria Nº 1347 - 20/11/14
 CRMV - 0415/17