

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
BACHARELADO EM ODONTOLOGIA**

**DENIS CANDEIA PEREIRA OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO CICATRICIAL *in vivo* DE MEMBRANAS DE QUITOSANA / *Cissus  
verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis**

**PATOS-PB  
2021**

**DENIS CANDEIA PEREIRA OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO CICATRICAL *in vivo* DE MEMBRANAS DE QUITOSANA / *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Rosana Araújo Rosendo.

**PATOS-PB  
2021**

O48a

Oliveira, Denis Candeia Pereira.

Avaliação cicatricial *in vivo* de membranas de quitosana/*Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis / Denis Candeia Pereira Oliveira.  
– Patos, 2021.

58 f. : il. color.

Monografia (Bacharelado em Odontologia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2021.

"Orientação: Profa. Dra. Rosana Araújo Rosendo".

Referências.

1. Materiais Odontológicos – Quitosana. 2. Membranas de Quitosana.  
3. Cicatrização. 4. Fitoterapia. 5. Odontologia. I. Rosendo, Rosana Araújo. II. Título.

CDU 616.314:62:61-035.5(043)

**DENIS CANDEIA PEREIRA OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO CICATRICIAL *in vivo* DE MEMBRANAS DE QUITOSANA / *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

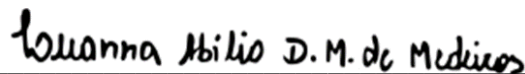
**Aprovado em 03/12/2021**

**BANCA EXAMINADORA**



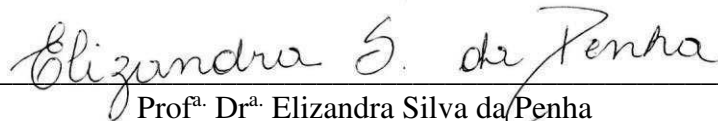
---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana Araújo Rosendo  
Universidade Federal de Campina Grande



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luanna Abílio Diniz Melquíades de Medeiros  
Universidade Federal de Campina Grande – 1º Membro



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizandra Silva da Penha  
Universidade Federal de Campina Grande – 2º Membro

Dedico este trabalho à minha família que comigo  
esteve em cada momento desta jornada.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, autor e consumidor de toda história humana, que me chamou à vida e, apesar de todo imérito me ornou com dons inestimáveis, gratidão por toda benevolência, misericórdia e providência ao longo destes anos. Desde o momento da aprovação no vestibular, até os presentes dias, senti fortemente Sua mão a me guiar, instruir e acalantar em todas as situações vividas. Posso dizer, com certeza, que Seu amor e fidelidade são imensuráveis e jamais se apartaram de mim. Que eu possa ser sempre sinal de Sua presença e instrumento de Sua cura nesta trajetória finita e cheia de percalços.

Aos meus pais, Natanael Oliveira de Lima e Lucineide Candeia Pereira que sempre me instruíram ao crescimento humano, intelectual e espiritual através de seus esforços contínuos e exemplos primeiros, minha eterna gratidão. Tenho consciência plena de que sou fruto de um amor genuíno, abnegado e calcado nos valores mais nobres e desprendidos. Apesar de não terem chegado ao ensino superior, por imposição das dificuldades econômicas e necessidade de prover recursos para suas manutenções, incentivaram-me sempre a alçar vãos maiores pela educação. Com eles entendi que os meus melhores amigos estão em casa; e com eles pude vivenciar os momentos mais distintos de dor e alegria, esperança e medo. Se até aqui cheguei, foi pelo apoio e oração deles.

Ao meu irmão, Alisson Candeia Pereira Oliveira que comigo sempre compartilhou as brincadeiras mais simples, os sorrisos mais autênticos, as lágrimas mais sentidas e as lutas e esperanças por dias melhores, meu mais sincero amor e gratidão. Nos últimos cinco anos pude experimentar sempre seu sincero desejo: “confie que já deu certo!”. Quando as semanas de prova chegavam e as madrugadas se tornavam pequenas, apesar de todo desconforto, nunca se furtou a me ajudar nas revisões dos questionários ou a dormir em outro cômodo do apartamento até o término dos estudos. Desejo que este elo de amparo, proteção e zelo mútuo seja sinal visível de nossa fraternidade e companheirismo.

Aos meus avós, especialmente maternos, José Pereira da Silva (*in memoriam*) e Ilza Candeia Pereira que ao longo da minha vida sempre proporcionaram muito amparo, amor e carinho, minha eterna gratidão. Não tem nenhuma memória da infância que não me faça recordá-los: os finais de semana no sítio, as pescarias, o almoço aos domingos, os cafés com comidas típicas aos sábados. Tudo tem cheiro de saudade. Obrigado também por todo apoio financeiro ao longo destes anos, que me possibilitou permanecer e, agora, concluir o curso. Infelizmente, vovô Zé de Maia não estará fisicamente para celebrar este momento, pois já

atravessou o caminho da vida e está em Deus, certamente intercedendo por nós. Aos meus avós paternos, Manoel Fernandes de Lima (*in memoriam*) e Ana Maria Oliveira (*in memoriam*), mesmo não tendo a oportunidade de convivência, por já estarem na morada eterna, minha gratidão por gerarem meu pai, alicerce de nossa família.

Aos meus tios e tias e primos e primas, que sempre se fizeram presentes na minha vida, seja com orações ou com apoio material, meu muito obrigado por tudo. Tenho consciência de que apesar de constituirmos uma família bem pequena, sempre buscamos nos apoiar em nossas necessidades. E as muitas lutas travadas nesta caminhada terrena serviram sempre para nos unir e entender que juntos conseguimos superar todas as dificuldades.

À Universidade Federal de Campina Grande, através de todo seu corpo docente, técnico e de funcionários terceirizados, minha reverência e gratidão. Ocupar o banco de uma instituição pública federal de ensino superior, infelizmente, ainda é privilégio para poucos. A academia sempre será o ambiente do diálogo, da divergência, da pluralidade de ideias, do livre pensamento e da busca incessante do saber. A universidade é e sempre será uma fonte inesgotável de conhecimento, mesmo que tenha de resistir às investidas de desmonte e sucateamento ou de perseguição e tentativa de censura. Posso dar testemunho do quanto este ambiente me moldou para vida e para a futura profissão que em breve estarei abraçando. Sempre terei orgulho de carregar o nome desta casa comigo e espero ainda orgulhá-la em um futuro breve.

Aos meus mestres, que compartilharam além de conhecimentos científicos e técnicos, lições de ética, empatia e humanização, meu eterno reconhecimento e profundo respeito. Cada momento vivido em sala de aula, laboratório ou clínica se eternizará na memória e no coração como expressão de doação plena, capaz de transbordar de si para preencher o outro. Dentre tantos, desejo destacar os professores Abrahão Alves de Oliveira Filho, Maria Angélica Sátyro Gomes Alves, Bárbara Vanessa de Brito Monteiro, Julierme Ferreira Rocha, Rosália Severo de Medeiros, Luciana Ferraz Gominho, Gymenna Maria Tenório Guênes, Eduardo Dias Ribeiro, Ana Carolina Lyra Albuquerque, Luanna Abílio Diniz Melquíades de Medeiros, Elizandra Silva da Penha e Rosana Araújo Rosendo como grandes exemplos de competência, generosidade e amor ao ofício que desempenham.

À minha orientadora, Rosana Araújo Rosendo, que para além do ensino na graduação e acompanhamento na iniciação científica se dignou a ser amparo, fonte de correção e porto seguro desde o terceiro período do curso, minha eterna gratidão. Tenho absoluta certeza de que foi a mão de Deus que uniu as nossas trajetórias para que se pudesse cumprir, plenamente, a

Sua graça em minha vida. O convite à participação no LBio e, conseqüentemente, a inscrição e aprovação dos projetos de pesquisa no PIBIC foram respostas de Deus às muitas incertezas e dúvidas que carregava. Entendi, portanto, que o Senhor tinha colocado um anjo para acalmar o coração e fortalecer o ânimo na caminhada perseguida. Jamais terei palavras suficientes para agradecer por toda confiança e generosidade em mim depositadas. Por isso, peço apenas que os céus possam recompensá-la generosamente com bençãos abundantes e graças portentosas.

À minha banca, constituída pelas professoras Luanna Abílio Diniz Melquíades de Medeiros e Elizandra da Silva Penha, minha estima e agradecimento por se fazerem presentes em tantos momentos significativos da graduação e, ainda mais, na defesa do trabalho de conclusão de curso. Carregarei no coração e na mente todo aprendizado, incentivo e colaboração compartilhados, além de tantos momentos descontraídos e de confraternização. Cada uma a seu modo, soube transmitir lições valiosas. Professora Luanna, com sua simplicidade, coerência e sempre visão ampliada das situações me ensinou a persistir, aprimorar o que já estava significativamente bom e confiar no processo que estava sendo vivenciado; seus elogios e conselhos me instigaram a crescer. Professora Elizandra foi a identificação mais genuína e sincera que eu pude experimentar na graduação, sempre com um desejo imenso de ajudar, aconselhar e a ver tudo com um olhar crítico e de questionamento para poder oferecer o melhor de si. Com ela aprendi muitas coisas em odontopediatria, mas essencialmente de que “sou responsável pelo que cativo no trato com os meus pacientes”. Não esquecerei, jamais, todas as caronas recheadas de risadas e conversas. Por tudo, muito obrigado.

À turma XVI de Odontologia, formada por tantas pessoas especiais, cheias de dons e carismas, especialmente humildade e companheirismo, minha gratidão por cada etapa vivida e compartilhada ao longo dos últimos cinco anos. Passamos mais tempos juntos, do que com nossas famílias. Por isso mesmo, tivemos que formar uma. Aprendemos a enxergar as limitações, potencialidades, aspirações e sentimentos mútuos. Tivemos ainda, que ajudar a levantar quem caía pelo caminho, enxugar as lágrimas daqueles que choravam, oferecer ombro para quem necessitava aliviar as angústias, ser solidário em muitas situações de vulnerabilidades. Agradeço pelas risadas, desesperos, noites de estudo, cafezinhos depois das provas, resumos emprestados, dúvidas sanadas. Entendi que juntos fomos mais fortes. Se pudesse viver tudo de novo, desejaria uma vez mais estar com vocês. E enquanto viver, guardarei cada um no coração.

Aos funcionários da clínica escola e central de aulas II, dentre os quais desejo citar com muito respeito e carinho: Damião, Vânia, Messias, Alex, Neuma, Poliana, Diana, Aline, Alex,



Amanda e Alexandre, muito obrigado por toda ajuda dispensada ao longo desta jornada. Com certeza todo o processo tornou-se mais confortável com o trabalho zeloso de cada um, seja organizando as salas de aula, laboratórios e clínicas, seja na listagem e marcação de pacientes. Vocês marcam positivamente a vida de cada pessoa que passa por esses ambientes.

Aos meus amigos, que me ajudaram de forma direta ou indireta ao longo da graduação, muitas vezes ouvindo, aconselhando ou até entendendo as ausências em decorrência de alguma atividade do semestre letivo, muito obrigado. Agradeço ainda as orações, que com certeza me sustentaram até aqui, dando-me forças para resistir a todas as adversidades encontradas. Não citarei nominalmente, para não cometer o ato falho de esquecer alguém. Mas, os trago no coração e os entrego em minhas orações.

Por fim, desejo agradecer à sociedade que com seus impostos mantém as Universidades Federais, espaços valiosos de ensino, pesquisa e extensão que contribuem para evolução científica e tecnológica da nação. Apesar da alta carga tributária cobrada dos contribuintes brasileiros, tenho plena certeza de que uma das melhores destinações é esta. Por isso, agradeço penhoradamente por me permitir alcançar mais um degrau no nível de conhecimento e adquirir o grau de bacharel em odontologia. Sem este espaço público e de qualidade, este sonho talvez não se realizasse. Muito obrigado!

*“Porque jamais se ouviu, nem se percebeu, tampouco escutou-se falar; nem olho algum sequer vislumbrou outro Deus, além de Ti, que age em favor daqueles que nele esperam”*

Isaías 64,4

## RESUMO

A Quitosana e a *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis apresentam propriedades físico-químicas e biológicas com potencial terapêutico na reparação de feridas cutâneas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de cicatrização cutânea de membranas de quitosana com ou sem incorporação de extrato vegetal, mediante aplicação em 60 ratos machos, da linhagem Wistar, com pesos entre 250 e 300g, com aprovação no comitê de ética em uso de animais. Para tanto, foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, sendo controle negativo, MQ 0%, MQ 5% e MQ 20% em tempos de 7, 15 e 30 dias. Uma vez implantados os biomateriais, e cumpridos os tempos preestabelecidos, os tecidos foram removidos em bloco, processados, corados com tricrômico de masson e analisados em microscopia de luz, avaliando-se infiltrado inflamatório, vascularização, cicatrização, colagenização, intensidade de coloração das fibras, edema, necrose tecidual e células gigantes multinucleadas. Os resultados mostraram presença de infiltrado inflamatório intenso para os grupos MQ 0% e MQ 5% comparativamente ao Controle em 7 dias e leve/ moderado para MQ 20%; vascularização induzida até o 15º dia para todos os grupos, com posterior declínio; cicatrização completa para MQ 20% com colagenização expressiva no tempo de 7 dias; e edema, necrose tecidual e células gigantes multinucleadas como eventos não significativos em todos os grupos e tempos avaliados. Conclui-se que os biomateriais testados desempenharam papel significativo na indução do reparo tecidual, modulando a reação inflamatória e atuando na reepitelização de feridas cutâneas.

**Palavra-chave:** Quitosana. Cicatrização. Fitoterapia.

## ABSTRACT

Chitosan and *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis have physico-chemical and biological properties with therapeutic potential for repairing skin wounds. The objective of this study is to evaluate the healing potential of chitosan membranes with or without incorporation of plant extract, by applying it to 60 male Wistar rats, weighing between 250 and 300g, from the Cuité campus of the Federal University of Campina Grande (UFCG), as approved by the ethics committee the use of animals. To this end they were randomly divided into 4 groups, Control, MQ 0%, MQ 5% and MQ 20% in times of 7, 15 and 30 days. Once the biomaterials were implanted and the pre-established times were fulfilled, the tissues were removed en bloc, processed, stained with masson's trichrome and analyzed under light microscopy, evaluating inflammatory infiltrate, vascularization, healing, collagenization, fiber staining intensity, edema, tissue necrosis and multinucleated giant cells. The results showed the presence of an intense inflammatory infiltrate for the MQ 0% and MQ 5% groups compared to the Control in 7 days and mild / moderate for MQ 20%; vascularization induced until the 15th day for all groups, with subsequent decline; complete healing for MQ 20% with expressive collagenization in 7 days; and edema, tissue necrosis and multinucleated giant cells as non-significant events in all groups and times evaluated. It is concluded that the tested biomaterials played a significant role in inducing tissue repair, modulating the inflammatory reaction and acting in the reepithelization of skin wounds.

**Keyword:** Chitosan. Healing. Phytotherapy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Esquema da síntese de quitosana pelo método químico.....	19
<b>Figura 2.</b> Estrutura química da quitosana.....	20
<b>Figura 3.</b> Planta <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson e CE Jarvis: A - hastes floridas com inflorescências jovens e uma haste jovem com gavinhas. B - vista dorsal do mesmo caule florido. C - região entre o caule e a raiz. D - um caule mais antigo. E - uma raiz com casca parcialmente removida. F - sistema radicular inteiro. G - inflorescências. H - botões de flores e uma flor. J - frutas maduras. Barras de escala: A - 3 cm. B, E, G, H - 2 cm. C, D, J - 1 cm. F - 4 cm.....	23
<b>Figura 4.</b> Membranas de quitosana sem/com extrato vegetal. Visão Macroscópica das membranas. Visão Superior da MQ 0% (A). Visão Superior da MQ 20% (B) Membranas cortadas com área de 1,00cm <sup>2</sup> para implantação nos animais, C1: MQ 0%, C2: MQ 5% e C3: MQ 20% (C).....	34
<b>Figura 5.</b> Anestesia por injeção intrepritoneal.....	35
<b>Figura 6.</b> Incisão de aproximadamente 15 mm de comprimento, realizada na pele e fáscia muscular do animal e introdução do biomaterial na loja cirúrgica.....	36
<b>Figura 7.</b> Síntese da ferida dorsal com pontos simples mononylon 5-0.....	36
<b>Figura 8.</b> Percentual e intensidade de fibroplasia das amostras por meio da técnica histoquímica do Tricrômico de Masson. 40x) .....	38
<b>Figura 9:</b> Intensidade do infiltrado inflamatório no período de tempo de 7 dias.....	41
<b>Figura 10:</b> Presença de vascularização no período de tempo de 7 dias.....	42
<b>Figura 11:</b> Processo de cicatrização no período de tempo de 7 dias.....	42
<b>Figura 12:</b> Quantidade de fibras colágenas no período de tempo de 7 dias.....	43
<b>Figura 13:</b> Intensidade de coloração do colágeno no período de tempo de 7 dias.....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Média dos escores atribuídos às membranas, após os intervalos de tempo de 7, 15 e 30 dias, para as oito condições avaliadas.....	40
---	----

## LISTA DE SÍMBOLOS

B	Beta
Cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
pH	Escala numérica adimensional de acidez ou basicidade de uma solução aquosa
G	Gramma
kDa	Kilodalton
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
Mg	Miligramma
ml	Mililitro
%	Porcentagem
Kg	Quilogramma

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EGF	Fator de crescimento epidérmico humano
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos
GC	Grupo Controle
MEC	Matriz extracelular
MQ 0%	Membranas de quitosana sem extrato vegetal
MQ 5%	Membranas de quitosana com 5% do extrato vegetal
MQ 20%	Membranas de quitosana com 20% do extrato vegetal
PMN	Polimorfonucleares
SLCF	Sistema de liberação controlada de fármaco



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>18</b>
2.1 BIOMATERIAIS.....	18
2.3 QUITOSANA.....	19
2.4 MEMBRANA DE QUITOSANA.....	21
2.5 <i>CISSUS VERTICILLATA</i> (L.) NICOLSON & C.E. JARVIS.....	22
2.6 CICATRIZAÇÃO TECIDUAL.....	23
2.7 ENSAIOS <i>in vivo</i> EM ANIMAIS.....	25
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>26</b>
<b>3 ARTIGO.....</b>	<b>32</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>53</b>
Anexo A.....	53
Anexo B.....	57
Anexo C.....	58

## 1 INTRODUÇÃO

Historicamente, mesmo sem conhecimento científico, o homem fez uso da natureza como fonte de materiais para resolver demandas e problemas associados ao seu estilo de vida. Com o decorrer do tempo, a partir do desenvolvimento de processos e dos biomateriais, foi então possível estabelecer relações entre as propriedades dos materiais e a aplicação dos mesmos em meio biológico (ROSENDO, 2016).

A definição mais difundida para biomaterial é a empregada pela American National Institute of Health, descrevendo-o como qualquer substância ou combinação de substâncias, que não drogas, sintéticas ou de origem natural, que podem ser usadas por qualquer período de tempo, e que aumentam ou substituem parcialmente ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, a fim de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo (BERGMANN; STUMPF, 2013).

Dentre os biomateriais está a quitosana que é um polissacarídeo natural, linear, derivado da quitina que pode ser total ou parcialmente desacetilado (WASUPALLI; VERMA, 2018). Uma característica deste polímero é a presença de grupos amino ao longo da cadeia polimérica que permite formar complexos com moléculas aniônicas, como lipídios, DNA, proteínas e polímeros sintéticos carregados negativamente (GEORGOPOULOU et al., 2018).

Este polissacarídeo apresenta várias propriedades biológicas como biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana, não toxicidade, não imunogenicidade, analgesia e hemostasia, atuando no reparo tecidual através do crescimento, fixação e proliferação celular (DUTTA, 2016; ROSENDO, 2016). Além disso, apresenta grande versatilidade quanto à sua aplicação e funcionalidade (ROSENDO, 2016).

A quitosana é um dos biomateriais mais usados em pele e sua aplicação é aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA). Ela promove a infiltração de células polimorfonucleares e estimula fortemente a proliferação de fibroblastos da pele humana, auxiliando o processo de cicatrização de feridas (GEORGOPOULOU et al., 2018). Devido a sua estrutura, é usada para liberação de biofármacos e também de moléculas bioativas, como Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos (FGF) e Fator de Crescimento Epidérmico Humano (EGF) (MOMENI et al., 2018). Suas propriedades mucoadesivas naturais permitem, ainda, o desenvolvimento de sistemas de transporte de fármacos bioadesivos que podem se ligar à mucosa intestinal, melhorando o tempo de permanência de fármacos em seu lúmen e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade (MUKHOPADHYAY et al., 2012; SANTOS et al., 2018).

Considerando a biodegradação lenta e contínua da molécula de quitosana, drogas

sintéticas e vegetais podem ser incorporadas a estes biomateriais para atuarem no reparo de tecidos, hemostasia, analgesia, assim como outras propriedades referentes à droga (JENNINGS, BUMGARDNER, 2016).

Ressalta-se assim, que as plantas são amplamente utilizadas como fontes medicamentosas para o tratamento de diversas doenças e afecções em seres humanos, e até em animais, desde os tempos primitivos (CAETANO et al., 2015).

Uma planta bastante utilizada na cura de abscessos, inflamação e hemorragia é a *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis, que pertence à família *Vitaceae*, e é difundida popularmente pelo nome de “Insulina” (DROBNICK, DE OLIVEIRA, 2015). O seu desempenho como cicatrizante em ensaios pré-clínicos em coelhos mostrou-se como potencial alternativa terapêutica no tratamento de reparação de feridas da pele (BRAGA, 2008; MILLHER et al., 2015).

Vários estudos farmacológicos de ação hipoglicemiante e antilipêmico têm sido realizados com extratos fluidos, decocto, infuso e extrato aquoso de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis, em ratos normais e diabéticos agudos e crônicos, avaliando-se a sua atuação na redução da glicemia e dos triglicerídeos nos mesmos (BRAGANÇA, 1996; LIZAMA, MARTINEZ; PEREZ, 2000).

Dessa forma, e em virtude das evidências supracitadas, buscou-se realizar testes *in vivo* das membranas de quitosana com e sem incorporação de extrato de insulina, a fim de avaliar o processo de cicatrização tecidual com participação das mesmas, tendo em vista a possibilidade de aplicação de um novo biomaterial com tecnologia e materiais nacionais.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 BIOMATERIAIS

Com o progresso da tecnologia os biomateriais passaram, cada vez mais, a ser explorados na medicina e na indústria para diversas aplicações, principalmente no desenvolvimento de sistemas de transporte controlado de fármacos (JAYAKUMAR; PRABAHARAN; MUZZARELLI, 2011).

Os avanços das pesquisas em regeneração tecidual apresentam uma nova geração de biomateriais que se assemelham cada vez mais à Matriz Extracelular (MEC) natural fornecendo um ambiente de suporte para manter a adesão, migração, expansão e diferenciação celular dentro do corpo. Essa geração de biomateriais pode ser categorizada de acordo com sua natureza como: natural, sintético ou combinado (HIEW; SIMAT; TEOH, 2018).

Os materiais naturais podem atuar como materiais reparadores para a regeneração de tecidos, como o colágeno e elastina, pois contêm construções semelhantes aos tecidos de origem (GARROS et al., 2006).

Os materiais à base de proteínas são conhecidos por serem apropriados para aplicações de engenharia de tecidos uma vez que as proteínas são vitais e fornecem estrutura para os mesmos. Os polissacarídeos atuam como materiais de suporte, já que são capazes de manter a estrutura da MEC e suas aplicações incluem diferenciação de células-tronco, transplante e reparo de feridas (RONG; CORRIE; CLARK, 2017; GHASSEMI et al., 2018).

Os materiais que funcionam imitando as características reguladoras e a complexidade dos biomateriais naturais são definidos como sintéticos. Estes podem ser à base de polímeros, metais, cerâmicas e grafenos. As vantagens do uso dos sintéticos sobre os derivados de fontes naturais incluem a alta reprodutibilidade, degradação controlável, propriedades mecânicas e facilidade de composição controlável dos materiais (DAWSON et al., 2008; HERMAWAN; DJUANSJAH; RAMDAN, 2011; DONG; QI, 2015).

No entanto, materiais sintéticos apresentam muitas vezes falta de adesão celular local, ausência de sinalização de reconhecimento celular e hidrofobicidade intrínseca, portanto, precisam ser reestruturados para gerar sinais químicos que permitam a cultura e a adesão celular (ASHAMMAKHI, 2009; HIEW; SIMAT; TEOH, 2018).

Para contornar as deficiências dos biomateriais sintéticos foi realizado a combinação com os naturais. A união de materiais sintéticos e naturais superam a limitação do uso exclusivo

de polímeros sintéticos, promovendo o suporte da adesão e proliferação celular adequadas aos arcabouços tridimensionais (DONG; QI, 2015).

## 2.2 QUITOSANA

A quitosana é um biopolímero hidrofílico, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. Trata-se de um polissacarídeo semicristalino, contendo resíduos de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina dispostos em dimensão linear (SPIN-NETO et al., 2008).

Sua descoberta se deu primeira vez em 1811, em um cogumelo, por um pesquisador francês chamado Henri Braconnot. Posteriormente, pesquisadores descobriram fontes alternativas, a partir de fungos, espécies aquáticas e outros organismos vivos terrestres (HALIM; PERIAYAH; SAAD, 2016.). Dentre estes, crustáceos e micélios fúngicos que foram amplamente utilizados em escala industrial, especialmente pela disponibilidade natural e custos de obtenção (DHILLON et al., 2013).

Dentre os métodos de extração de quitosana destacam-se os tratamentos químico e enzimático. O método químico (Figura 1) é amplamente aplicado devido ao seu custo-benefício e de grande produção em massa, através do processo de desacetilação química, principalmente, de crustáceos (CHEUNG et al., 2015). Este método envolve etapas de desmineralização, desproteinização, descoloração e desacetilação. Durante o processamento, as cascas dos crustáceos são desmineralizadas com o emprego de cloreto de hidrogênio e desproteinizadas com hidróxido de sódio para remover resíduos de minerais e proteínas, respectivamente. Em seguida, os tratamentos com óxido de potássio e manganês removem as moléculas pigmentadas, resultando em quitina transparente. Finalmente, a quitina é submetida a tratamento alcalino para formar a quitosana (MADNI et al., 2021).

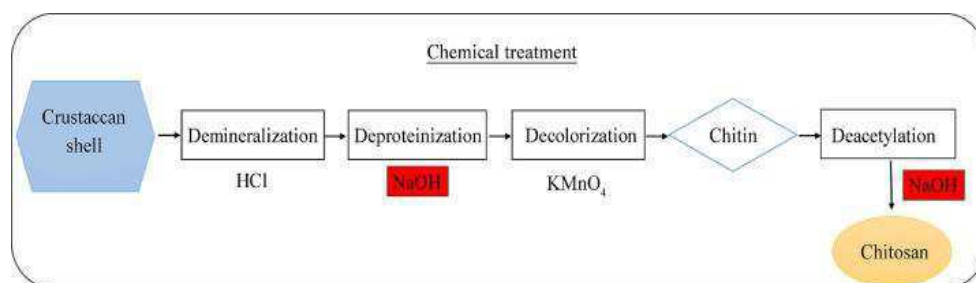


Figura 1 – Esquema da síntese de quitosana pelo método químico. Adaptada (Madni, 2021).

A molécula de quitosana possui natureza catiônica, devido à presença do grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) em sua estrutura (Figura 2). Essa carga positiva auxilia na formação da matriz extracelular ao atrair moléculas com carga negativa, como proteoglicanos (SIVASHANKARI; PRABAHARAN, 2016); e a presença do grupo hidroxila ( $\text{OH}$ ) na estrutura que também atrai moléculas carregadas positivamente para aumentar o potencial da ligação (RAHMANI DEL BAKHSHAYESH et al., 2018).

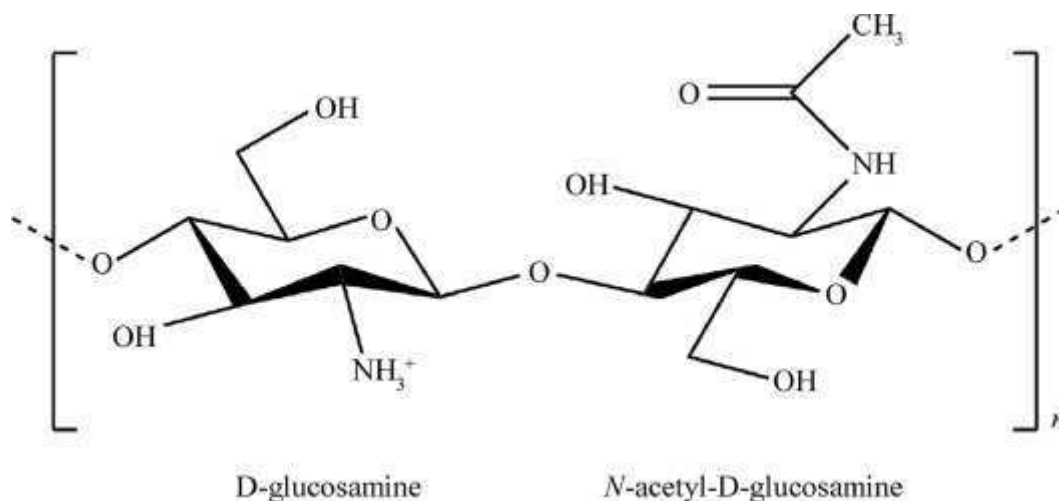


Figura 2 – Estrutura química da quitosana. (Madni, 2021).

Além das atrações eletrostáticas, esses grupos funcionais auxiliam na modificação da quitosana, melhorando assim suas propriedades mecânicas e biológicas para trazer novas propriedades funcionais e aplicações práticas promissoras (RUIZ; CORRALES, 2017).

A quitosana é insolúvel em água, em solventes orgânicos e em bases, mas é solúvel na maioria das soluções de ácidos orgânicos com pH inferior a 6 (DAMIAN et al., 2005); seu peso molecular pode variar de 30 a 1000 kDa e o grau de desacetilação de 50 a 95%, o qual depende principalmente de sua fonte e método de preparação (WASUPALLI; VERMA, 2018).

Suas propriedades biológicas incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana, não toxicidade, não imunogenicidade, analgesia e hemostasia (ROSENDO, 2016). Além disso, a quitosana aliada a materiais naturais poliméricos e biocerâmicas pode ser aplicada para a regeneração de tecidos (MEDEIROS et al., 2016). Sendo, portanto, um material ideal para curativos de feridas, Sistema de Liberação Controlada de Fármacos (SLCF), *scaffolds* e biomembranas, agindo no processo de regeneração tecidual (CROISIER; JÉRÔME, 2013; WASUPALLI; VERMA, 2018).

É um dos biomateriais mais usados em pele e sua aplicação é aprovada pelo *Food and Drug Administration*. Esta promove a infiltração de células polimorfonucleares e estimula fortemente a proliferação de fibroblastos da pele humana, portanto, auxiliando o processo de cicatrização de feridas (GEORGOPOULOU et al., 2018). Devido à sua estrutura, é usada para liberação de biofármacos e também de moléculas bioativas, como por exemplo FGF e o EGF (MOMENI et al., 2018). Outra ação da quitosana é sobre as plaquetas promovendo a liberação do fator de crescimento derivado de plaquetas AB e fator de transformação do crescimento  $\beta 1$ , que desempenham papel importante na cicatrização (DUTTA, 2016).

Essas características químicas e biológicas da quitosana estimulam pesquisas no desenvolvimento de sistemas de liberação para uma ampla gama de agentes biológicos (DEEPA DEEPA; JAYAKUMAR; CHENNAZHI, 2018). Suas propriedades mucoadesivas naturais permitem o desenvolvimento de sistemas de transporte de fármacos bioadesivos que podem se ligar à mucosa intestinal melhorando o tempo de permanência de fármacos no lúmen intestinal e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade (MUKHOPADHYAY et al., 2012; SANTOS et al., 2018). Dentre as formas de apresentação da quitosana, cabe destacar as membranas.

### 2.3 MEMBRANAS DE QUITOSANA

O potencial de construções membranosas à base de quitosana é amplamente explorado dentro da área de engenharia de tecidos. As membranas de quitosana possuem uma adequada resistência mecânica aliada a uma permeabilidade molecular seletiva. Por ser um material seletivamente permeável surgiu como bom candidato para emprego em liberação controlada de medicamentos no meio gastrintestinal e na mucosa oral, tendo sido proposto utilizá-la como material para a liberação de antibióticos para a redução bacteriana local em aplicações orais (TAKEUCHI et al., 2003).

Vários estudos têm sido desenvolvidos associando-se a quitosana a fármacos, com finalidades diversas. Holanda (2011) desenvolveu e avaliou membranas de quitosana reticuladas com o tripolifosfato de sódio (TPP), concluindo que as mesmas apresentaram viabilidade para serem utilizadas como biomaterial em sistema de liberação controlada de insulina.

Liu e colaboradores (2019) avaliaram membranas de quitosana-aloevera-curcumina na promoção da regeneração do tecido cutâneo em feridas de espessura total. Os ensaios *in vitro* mostraram características físico-químicas adequadas e atividades antimicrobianas contra os microrganismos testados. Além disso, células de fibroblastos de camundongo NIH-3T3

cultivadas em membrana modularam de forma eficiente a proliferação de células. Assim, o composto de membrana carregado com curcumina tem a capacidade de promover a cicatrização eficaz de feridas, juntamente com o controle de patógenos.

Rosendo (2016) avaliando membranas de quitosana observou que o processo utilizado para a obtenção das mesmas a partir de uma matriz polimérica de quitosana e de quitosana / *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis mostrou-se eficaz, e que a superfície das membranas se apresentou de maneira uniforme, lisa e plana.

As membranas de quitosana além de serem empregadas em sistemas de liberação de fármacos, são amplamente utilizadas em outras aplicações, como: empacotamento de alimentos, pele artificial e cicatrização de ferimentos (CHEN et al., 2019).

#### 2.4 *CISSUS VERTICILLATA* (L.) NICOLSON & C.E. JARVIS

Trata-se de uma planta originária da República Dominicana (CANO; VOLPATO, 2004). Seu gênero *Cissus* é o maior da família Vitaceae, sendo constituído de cerca de 350 a 400 espécies de trepadeiras, com uma distribuição pantropical (BELTRAME et al., 2001).

Ao longo dos anos, ela recebeu vários nomes, incluindo: *C. cordifolia* L., *Viscum verticillatum* L. e *Vitis sicyoides* (L.); e na literatura, a planta é conhecida também como *Cissus sicyoides* e popularmente difundida pelo nome de “Insulina” (DROBNIK; DE OLIVEIRA, 2015).

Estudos etnofarmacológicos envolvendo preparações de folhas constataram que o extrato aquoso de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis apresentou efeito anti-inflamatório (GARCIA et al., 2000), efeito citostático (LIZAMA et al., 2000) e vasoconstritor (GARCIA et al., 1997). Posteriormente, Barbosa et al. (2002), Pepato et al. (2003) e Viana et al. (2004) comprovaram que extratos aquosos de folhas desta planta possuem ação hipoglicemiante e anti-lipêmica; além disso, o extrato metanólico possui uma ação gastroprotetora (FERREIRA et al., 2008).

Na medicina tradicional do Brasil, as partes aéreas da planta são utilizadas contra reumatismo, epilepsia e acidente vascular cerebral, e também no tratamento de diabetes mellitus tipo 2 (VIANA et al., 2004, OLIVEIRA, 2012).

Na medicina popular é administrado como um chá preparado a partir das partes vegetativas (OLIVEIRA, 2012), ou por meio de uma decocção foliar com funções amplamente conhecidas, como reduzir a glicemia sanguínea (LINO et al., 2007). Outras ações



medicamentosas confirmadas até agora são: anti-inflamatória (GARCIA et al., 2000) e anticonvulsivante (MEDEIROS et al., 2002).

Em estudos anatômicos e histoquímicos foram observados idioblastos em todo o corpo vegetativo da planta (Figura 3), que se constituem como sítios de secreção de compostos fenólicos, principalmente taninos, óleos essenciais e polissacarídeos, incluindo mucilagem. Essas células são as principais responsáveis pelas atividades farmacológicas da planta (OLIVEIRA, 2012). Os compostos fenólicos e os óleos essenciais determinam a utilização na medicina tradicional contra várias doenças, por exemplo, inflamação geral e hemorragia (SIMÕES et al., 2004).



Figura 3 – Planta *Cissus verticillata* (L.) Nicolson e CE Jarvis: A - hastes floridas com inflorescências jovens e uma haste jovem com gavinhas. B - vista dorsal do mesmo caule florido. C - região entre o caule e a raiz. D - um caule mais antigo. E - uma raiz com casca parcialmente removida. F - sistema radicular inteiro. G - inflorescências. H - botões de flores e uma flor. J - frutas maduras. Barras de escala: A - 3 cm. B, E, G, H - 2 cm. C, D, J - 1 cm. F - 4 cm. (DROBNIK; DE OLIVEIRA, 2015).

## 2.5 CICATRIZAÇÃO TECIDUAL

A cicatrização tecidual é um processo fisiológico complexo e importante que representa a vantagem evolutiva dos organismos e se dá através de estágios ordenados sobrepostos e que

envolvem uma interação altamente complexa de várias células e moléculas reguladoras que podem sempre desempenhar papéis adequados e vitais por meio de sinalização precisa para garantir a realização completa do processo (ACHARYA et al., 2016; SORG et al., 2017).

Em condições normais, as feridas cicatrizam de acordo com uma sequência específica que inclui: coagulação, inflamação, angiogênese, formação de fibroblastos e colágeno, reepitelização e remodelagem tecidual (CAETANO et al., 2015; MESCHER, 2016).

Em feridas de espessura superficial ou parcial, onde o dano é limitado à epiderme, apenas a epiderme precisa ser regenerada, resultando em cicatrização rápida e mínima formação de cicatriz (OJEH et al., 2015). Entretanto, em feridas graves que penetram mais profundamente na camada dérmica média com avulsão da pele ou exposição da subcutânea, complicações como a infecção podem se desenvolver e a cicatrização pode se prolongar por mais tempo (OJEH et al., 2015; MACHADO et al., 2018).

A duração do reparo pode variar entre indivíduos, dependendo de fatores locais (hipóxia tecidual, isquemia, corpos estranhos, maceração de tecidos e exsudatos), infecção, interrupção da regulação do processo inflamatório, fatores sistêmicos (diabetes, obesidade e doenças vasculares), gravidade da ferida e comprometimento do estado nutricional ou imunológico do indivíduo (YOU; HAN, 2014; OJEH et al., 2015; MACHADO et al., 2018).

Alternativas terapêuticas têm sido procuradas para o tratamento de várias doenças de pele, especialmente para auxiliar no processo de cicatrização tecidual. A cicatrização dessas lesões ocorre pela reconstrução do sítio, a fim de restaurar sua integridade e função (MACHADO et al., 2018).

No entanto, recriar um ambiente que promova mecanismos homeostáticos fundamentais que possibilitem otimizar a sobrevivência, proliferação, diferenciação, apoptose e angiogênese celular e fornecer suporte estromal adequado e pistas de sinalização constitui um desafio significativo e a chave para gerar com sucesso um processo de reparo útil (TILKORN et al., 2010).

Ressalta-se, então, que o campo de materiais de matriz e scaffolds para fornecer suporte estrutural e promover a migração celular, tem se mostrado promissor e, para isso, uma variedade de componentes diferentes para substitutos teciduais estão sendo examinados, cada um com suas características físicas (tamanho dos poros, elasticidade) e biológicas (adesão celular, migração celular), como colágenos, fibrina / fibronectina, elastina, gelatina, glicosaminoglicanos e, especialmente, a quitosana (TILKORN et al., 2010; CORIN; GIBSON, 2010; OJEH et al., 2015; DICKINSON; GERECHE, 2016; SALAMONE et al., 2016).

## 2.6 ENSAIOS *in vivo* EM ANIMAIS

A experimentação animal se reveste de uma importância incalculável nas pesquisas científicas, contribuindo sobremaneira para o desenvolvimento da ciência e tecnologia. Sua vasta contribuição em diferentes áreas vem promovendo ao longo dos anos, a descoberta de medidas profiláticas e tratamentos de inúmeras enfermidades que acometem os seres vivos (FAGUNDES; TAHA, 2004; ANDRADE, 2006).

Mesmo com o progresso de métodos alternativos nas últimas décadas (estudos *in vitro*, culturas de células e outros), os modelos animais ainda apresentam como principal vantagem, o fornecimento de informações sobre o organismo como um todo, fato que não é alcançado plenamente em outros métodos (HEYWOOD, 1987; RIBEIRO; CAMPOS; TIRAPEGUI, 1995; SALÉN, 1995; SNITKOFF, 2004).

Para a utilização de animais de laboratório, torna-se imprescindível considerar a ética e o regramento legal ao qual estes experimentos estão submetidos. Os estudos *in vivo* são importantes e oferecem uma ampla gama de possibilidades para examinar toxicidade de drogas, biocompatibilidade de materiais, patologias teciduais e explorar os possíveis potenciais terapêuticos de novos fármacos promovendo paralelos com resultados de ensaios em seres humanos (HOOIJMANS et al., 2014; PARETSIS et al., 2017).

Para simular condições aproximadas ao organismo humano, os animais de laboratório devem ser criados e produzidos sob condições ideais e mantidos em um ambiente controlado com monitoração regular (ANDRADE; PINTO; DE OLIVEIRA, 2006). Os roedores são os animais mais utilizados, pois atendem a características como: facilidade de manuseio, fácil domesticação, adaptação a ambientes variados e sociabilidade (UNDERWOOD et al., 2013).

A linhagem de ratos Wistar é uma das mais utilizadas em pesquisas de laboratório e seu uso deve-se ao fato das inúmeras pesquisas já realizadas o tornarem conhecido e consagrado para as mesmas (ANDERSEN et al., 2004; HOOIJMANS et al., 2014; PARETSIS et al., 2017).

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA N., ACHARYA S., SHAH U., SHAH R., HINGORANI L. A comprehensive analysis on *Symplocos racemosa* Roxb.: Traditional uses, botany, phytochemistry and pharmacological activities. **Journal Ethnopharmacol**, v. 181, p. 236-251, 2016.
- ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. **São Paulo: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)**, p. 167, 2004.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; DE OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. SciELO - Editora FIOCRUZ, 2006.
- ANDRADE, M. C. R. A utilização de símios do gênero *Callithrix* como modelo experimental. 2006. Disponível em URL: <http://www.cobea.org.br/artigo4.htm>.
- ASHAMMAKHI, N. **Topics in Tissue Engineering**, v. 5, n. 1, p.1-33, 2009.
- BARBOSA, W. L.; SANTOS, W. R. A.; PINTO, L. N.; TAVARES, I. C. C. Flavonóides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 12, p.13-15, 2002.
- BELTRAME, F. L.; SARTORETTO, J. L.; BAZOTTE, R. B.; CUMAN, R.N.; CORTEZ, D. A. G. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 783-785, 2001.
- BERGMANN, C. P.; STUMPF, A. Biomaterials. In: BERGMANN, C.; STUMPF, A. (Eds.). **Dental Ceramics: Microstructure, Properties and Degradation. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg**, p. 9-13, 2013.
- BRAGA, T. V. Avaliação da atividade farmacológica de *Cissusverticillata* (L.) Nicolson & CE Jarvis como antioxidante, antifúngico, hipoglicemiante e cicatrizante. **Dissertação** (Universidade Federal de Ouro Preto) Ouro Preto, 2008.
- BRAGANÇA, L. A. R. Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar. Niterói - Rio de Janeiro: **Editora da Universidade Federal Fluminense**, p.300, 1996.
- CAETANO, G. F.; FRADE, M. A.; ANDRADE, T. A.; LEITE, M. N.; BUENO, C. Z.; MORAES, Â. M.; RIBEIRO-PAES, J. T. Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.103, n. 5, p. 1013-1022, 2015.
- CANO, J. H.; VOLPATO, G. Herbal mixtures in the traditional medicine of eastern Cuba. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 293-316, 2004.
- CHEN, Y., QIU, H.Y., DONG, M.H., CHENG, B., JIN, Y.G., TONG, Z.R., LI, P.W., LI, S.D., YANG, Z.M. Preparation of hydroxylated lecithin complexed iodine/carboxymethyl chitosan/sodium alginate composite membrane by microwave drying and its applications in infected burn wound treatment. **Carbohydr. Polym**, v. 206, p. 435-445, 2019.

- CHEUNG, R.; NG, T.; WONG, J.; CHAN, W. Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications. **Drugs**, v.13, p. 5156-5186, 2015.
- CORIN, K. A.; GIBSON, L. J. Biomaterials. **Biomaterials**, v. 31, p. 4835-4845, 2010.
- CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780-792, 2013.
- DAMIAN, C. et al. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 16, n. 2, p. 195-205, abr./jun., 2005.
- DAWSON, E.; MAPILI, L.; ERICKSON, K.; TAQVI, S.; ROY, K. Biomaterials for stem cell differentiation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 2, p. 215-228, Jan., 2008.
- DEEPA, N.; JAYAKUMAR, R.; CHENNAZHI, K. P. Versatile carboxymethyl chitin and chitosan nanomaterials: a review. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 6, n. 6, p. 574-598, 2018.
- DHILLON, G.S.; KAUR, S.; BRAR, S. K.; VERMA, M. Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia. **Crit. Rev. Biotechnol**, v. 33, p. 379-403, 2013.
- DICKINSON, L. E.; GERECHT, S. Engineered biopolymeric scaffolds for chronic wound healing. **Front Physiol**, v. 7, p. 623, 2016.
- DONG, H. S.; QI, S. J. Realising the potential of graphene-based materials for biosurfaces – A future perspective. **Biosurface and Biotribology**, v. 1, n. 4, p. 229-248, 2015.
- DROBNIK, J.; DE OLIVEIRA, A. B. *Cissus verticillata* (L.) Nicolson and C. E. Jarvis (Vitaceae): Its identification and usage in the sources from 16th to 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 317-329, 2015.
- DUTTA, P. K. **Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine**. Springer India, 2016.
- FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, p. 59-65, 2004.
- FERREIRA, M. P., NISHIJIMA, C. M., SEITO, L. N., DOKKEDAL, A. L., LOPES-FERREIRA, M., DISTASI, L. C., VILEGAS, W., HIRUMA-LIMA, C. A. Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitric oxide. **J. Ethnopharmacol**, v.117, p. 70-174, 2008.
- GARCIA, M. D.; QUILEZ, A. M.; SAENZ, M. T.; MARTINEZ-DOMINGUES, M. E.; DE LA PURERTA, R. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L. species used in the Caribbean traditional medicine. **J. Ethnopharmacol**, v. 71, p. 395-400, 2000.
- GARCIA, X.; CARTES-HEREDIA, L.; LORENZANA-JIMENEZ, M.; GIJÓN, E. Vasoconstrictor effect of *Cissus sicyoides* on guinea-pigaortic rings. **Gen. Pharmacol**, v. 29, p. 457-462, 1997.

GARROS, I. C.; CAMPOS, A. C. L.; TÂMBARA, E. M.; TENÓRIO, S. B.; TORRES, O. G. M.; AGULHAM, M. A.; ARAÚJO, A. C. F.; SANTIS-ISOLAN, P. M. B.; OLIVEIRA, R. M.; ARRUDA, E. C. M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, p. 55-65, 2006.

GEORGOPOULOU, A.; KALIVA, M.; VAMVAKAKI, M.; CHATZINIKOLAIDOU, M. Osteogenic Potential of Pre-Osteoblastic Cells on a Chitosan-graft-Polycaprolactone Copolymer. **Materials (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 4, Mar., 2018.

GHASSEMI, T.; SHAHROODI, A.; MOHAMMAD, H. E.; MOUSAVIAN, A.; MOVAFFAGH, J.; MORADI, A. Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. **The Archives of Bone and Joint Surgery**, v. 6, n. 2, p. 90-99, Mar., 2018.

HALIM, A.; PERIAYAH, M.; SAAD, A. M. Chitosan: a promising marine polysaccharide for biomedical research. **Pharmacogn.** v. 10, p. 39, 2016.

HERMAWAN, H.; DJUANSJAH, J. R. P.; RAMDAN, D. Metals for Biomedical Applications. In: FAZEL-REZAI, R. (Ed.). **Biomedical Engineering**. Rijeka: InTech, 2011.

HEYWOOD, R. The use of animals in testing. **ATLA**, v. 14, p. 329-33, 1987.

HIEW, V. V.; SIMAT, S. F. B.; TEOH, P. L. The Advancement of Biomaterials in Regulating Stem Cell Fate. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 14, n. 1, p. 43-57, Fev., 2018.

HOOIJMANS, C. R.; INTHOUT, J.; RITSKES-HOITINGA, M.; ROVERS, M.M. Meta-analyses of animal studies: an introduction of a valuable instrument to further improve healthcare. **Ijar Journal**, v. 55, n. 3, p. 418-426, 2014.

HOLANDA, A. L. Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização. **Tese (Doutorado em Engenharia de Processos), Universidade Federal de Campina Grande**, Campina Grande, 113p, 2011.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; MUZZARELLI, R. A. A. **Chitosan for Biomaterials II**. Springer Berlin Heidelberg, 2011.

JENNINGS J. A.; BUMGARDNER J. D. Chitosan Based Biomaterials, Tissue Engineering and Therapeutics. **United Kingdom: Woodhead Publishing**, v. 2, 2016.

LINO, C. S.; SALES, T. P.; GOMES, P. B.; FALCÃO DO AMARAL, J.; ALEXANDRE, F. S. O.; SILVEIRA, E. R.; FERREIRA, J. M.; SOUSA, D. F.; QUEIROZ, M. G. R.; SOUSA, F. C. F.; BRITO, G. A. C.; BRITO, S. M. R. C.; VIANA, G. S. B. Anti-diabetic activity of a fraction from *Cissus verticillata* and tyramine, its main bioactive constituent, in alloxan-induced diabetic rats. **Am. J. Pharmacol. Toxicol**, ed. 4, v. 2, p.178-188, 2007.

LIZAMA, R. S.; MARTINEZ, M. M.; PEREZ, O. C. Contribución al estudio de *Cissus sicyoides* L. (bejuco cubí). **Revista Cubana de Farmácia**, v. 34, n. 2, p. 120-124, 2000.

LIU, X. C.; YOU, L. J.; TARAFDER, S.; ZOU, L.; FANG, Z. X.; CHEN, J. D.; LEE, C. H.; ZHANG, Q. Q. Curcumin-releasing chitosan/alginate membrane for skin regeneration. **Chem. Eng. J.** v. 359, p. 1111-1119, 2019.

MACHADO, G. H. A.; MARQUES, T. R.; CARVALHO, T. C. L.; DUARTE, A. C.; OLIVEIRA, F. C.; GONÇALVES, M. C.; PICCOLI, R. H.; CORRÊA, A. D. Antibacterial activity and in vivo wound healing potential of phenolic extracts from jaboticaba skin. **Chemical Biology & Drug Design**, Mar., 2018.

MADNI, A.; KHAN, R.; IKRAM, M.; NAZ, S. S.; KHAN, T.; WAHID, F. Fabrication and characterization of chitosan-vitamin C-lactic acid composite membrane for potential skin tissue engineering. **Int. J. Polym. Sci.**, p. 1-8, 2021.

MEDEIROS, A. C. C.; LACERDA, A. M. R.; SILVA, L. A. C. T.; VIANA, G. S. B.; VALE, T. G. Efeito anticonvulsivante do extrato aquoso (EA) de *Cissus sicyoides*. XXXIV **Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, Águas de Lindóia SP, Brasil, 2002.

MEDEIROS, L. A. D. M.; BARBOSA, R. C.; ROSEDO, R. A.; OLIVEIRA, D. K. M.; VIANA, F. A. C.; FOOK, M. V. L. Esferas de quitosana/D. ambrosioides (mastruz) para aplicação como biomaterial. **Revista Brasileira de Odontologia**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 2, p. 124-9, Abr./Jun., 2016.

MESCHER, A. **Junqueira's Basic Histology Text & Atlas (14th ed.)**, 2016.

MILLER; ANDREW, B. et al. The antibacterial and antifungal activity of essential oils extracted from Guatemalan medicinal plants. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 4, p. 548-554, 2015.

MOMENI, M.; ZAREHAGHIGHI, M.; HAJIMIRI, M.; KHORASANI, G.; DINARV, R.; NEKOOKAR, A.; SODEIFI, N.; KHOSRAVANI, P.; SHAYANASL, N.; EBRAHIMI, M. In vitro and in vivo investigation of a novel amniotic-based chitosan dressing for wound healing. **Woundrepair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 26, n. 1, p. 87-101, Jan., 2018.

MUKHOPADHYAY, P.; MISHRA, R.; RANA, D.; PATIT P.; KUNDU. Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 11, p. 1457-1475, 2012.

OJEH, N.; PASTAR, I.; TOMIC-CANIC, M.; STOJADINOVIC, O. Stem cells in skin regeneration, wound healing, and their clinical applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 25476-25501, 2015.

OLIVEIRA, A. B. DE Anatomy and histochemistry of the vegetative organs of *Cissus verticillata*: a native medicinal plant of the Brazilian Amazon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 1201-1211, 2012.

PARETSIS, N. F.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; CORREA, L.; PEPLIS, A. M. G.; MARTINS, V. C. A.; CORTOPASSI, S. R. G.; ZOPPA, A. L. V. Avaliação histológica e

histomorfométrica da regeneração óssea a partir da utilização de biomateriais em tíbias de ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 1537-1544, 2017.

PEPATO, M. T.; BAVIERA, A. M.; VENDRAMINI, R. C.; PEREZ, M. P. M. S.; KETTELHUT, I. C.; BRUNETTI, I. L. *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin - diabetic rats. **Biotechnol. Appl. Biochem**, v. 37, p. 15-20, 2003.

RAHMANI DEL BAKHSHAYESH, A.; ANNABI, N.; KHALILOV, R.; AKBARZADEH, A.; SAMIEI, M.; ALIZADEH, E.; ALIZADEH-GHODSI, M.; DAVARAN, S.; MONTASERI, A. Recent advances on biomedical applications of scaffolds in wound healing and dermal tissue engineering. **Artif. Cells Nanomed. Biotechnol**, v. 46, p. 691-705, 2018.

RIBEIRO, S. M. L.; CAMPOS, P.; TIRAPEGUI, J. O rato como animal de laboratório: histórico, dados biológicos e análise crítica de seu uso. **Rev. Farm. Bioquím. Univ.**, v. 31, p. 8-21, 1995.

RONG, G.; CORRIE, S. R.; CLARK, H. A. Biosensing in vivo: progresso e perspectivas. **Sensores ACS**, v. 2, n. 3, p. 327-338, 2017.

ROSENDO, R. A. Desenvolvimento e caracterização de scaffolds de quitosana / *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Materiais) – UFCG, Campina Grande, 161p. 2016.

RUIZ, G. A. M.; CORRALES, H. F. Z. Chitosan, chitosan derivatives and their biomedical applications. **Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides, Books on Deman (BoD)**, p.87-106, 2017.

SALAMONE, J. C.; SALAMONE, A. B.; SWINDLE-REILLY, K.; LEUNG, KX-C.; MCMAHON, R. E. Grand challenge in Biomaterials-wound healing. *Regen. Biomater.*, v. 3, p. 127-128, 2016.

SALÉN, J. C. W. Animal models: principles and problems. In: ROLLIN B. E., KESSEL M. L. *The experimental animal in biomedical research: care, husbandry and well-being: an overview by species*. **CRC Press**, p. 560, 1995.

SANTOS, L. F.; CORREIA, I. J.; SILVA, A. S.; MANO, J. F. Biomaterials for drug delivery patches. **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 118, p. 49-66, Jun. 2018.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **FARMACOGNOSIA: DA PLANTA AO MEDICAMENTO**. EDITORA DA UFRGS/UFSC, Porto Alegre, 2004.

SNITKOFF, G. G. Testes biológicos. In: Gennaro A. R. *Remington: a ciência e a prática da farmácia*. **Guanabara Koogan**, p.556-68, 2004.

SPIN-NETO, R. et al. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, p. 155-161, 2008.



SIVASHANKARI, P. R.; PRABAHARAN, M. Prospects of chitosan-based scaffolds for growth factor release in tissue engineering. **Int. J. Biol. Macromol**, v.93, p. 1382-1389, 2016.

SORG, H.; TILKORN, D. J.; HAGER, S.; HAUSER, J.; MIRASTSCHISKI, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **Eur Surg Res**, v. 58, p. 81-94, 2017.

TAKEUCHI, H.; MATSUI, Y.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. **Journal of Controlled Release**, v. 86, p. 235-242, 2003.

TILKORN, D. J.; LOKMIC, Z.; CHAFFER, C. L.; MITCHELL, G. M.; MORRISON, W. A.; THOMPSON, E. W. Disparate companions: tissue engineering meets cancer research. **Cells Tissues Organs**, v. 192, p.141-157, 2010.

UNDERWOOD, W.; ANTHONY, R.; GWALTNEY-BRANT, S.; POISON, A. S. P. C. A.; MEYER, R. American Veterinary Medical Association guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. Schaumburg, IL. **American Veterinary Medical Association**, 2013.

VIANA, G. S. B.; MEDEIROS, A. C. C.; LACERDA, A. M. R.; LEAL, K. A. M.; VALE, T. G. F.; MATOS, J. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC Pharmacol**, v. 4, p. 9-16, 2004.

WASUPALLI, G. K.; VERMA, D. Molecular interactions in self-assembled nano-structures of chitosan-sodium alginate-based polyelectrolyte complexes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 10-17, 2018.

YOU, H. J.; HAN, S. K. Cell therapy for wound healing. **Journal of Korean Medical Science**, v. 29, n. 3, p. 311-319, 2014.

### 3 ARTIGO

#### **Avaliação do Potencial de Cicatrização *in vivo* de Membranas de Quitosana / *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis**

**Denis Candeia Pereira Oliveira<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Lia Fook<sup>2</sup>, Rogério Lacerda-Santos<sup>3</sup>,  
Luanna Abílio Diniz Melquiades de Medeiros<sup>4</sup>, George João Ferreira do Nascimento<sup>4</sup>,  
Elizandra Silva da Penha<sup>4</sup>, Rosana Araújo Rosendo<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Aluno de graduação do curso de bacharelado em Odontologia, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Paraíba, Brasil.

<sup>2</sup>Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais/DEMa/UFCG, Paraíba, Brasil.

<sup>3</sup> Professor Associado do Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Minas Gerais, Brasil.

<sup>4</sup> Professor Adjunto da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Paraíba, Brasil.

### RESUMO

A Quitosana e a *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis apresentam propriedades físico-químicas e biológicas com potencial terapêutico na reparação de feridas cutâneas. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de cicatrização de membranas de quitosana com ou sem incorporação de extrato vegetal, a partir da aplicação em ratos, conforme aprovação no comitê de ética em uso de animais. Para tanto, foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, sendo controle negativo, MQ 0%, MQ 5% e MQ 20% e avaliados em 7, 15 e 30 dias. Uma vez implantados os biomateriais, e cumpridos os tempos preestabelecidos, os tecidos foram removidos em bloco, processados, corados com tricrômico de masson e analisados em microscopia de luz, avaliando-se os eventos infiltrado inflamatório, vascularização, cicatrização, colagenização e intensidade de coloração das fibras. Os resultados mostraram presença de infiltrado inflamatório intenso para os grupos MQ 0% e MQ 5% comparativamente ao Controle em 7 dias e leve/ moderado para MQ 20%; vascularização induzida até o 15º dia para todos os grupos, com posterior declínio; cicatrização completa para MQ 20% com colagenização expressiva no tempo de 7 dias. Conclui-se que, os biomateriais testados desempenharam papel significativo na indução do reparo tecidual, modularam a reação inflamatória e atuaram na reepitelização de feridas cutâneas.

**Palavras-chave:** Quitosana. Cicatrização. Fitoterapia.

## 1 INTRODUÇÃO

A *American National Institute of Health* conceitua biomaterial como qualquer substância ou combinação de substâncias, que não drogas, sintéticas ou de origem natural, que podem ser usadas por qualquer período de tempo, e que aumentam ou substituem parcialmente ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, a fim de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo<sup>1</sup>.

Dentre os biomateriais está a quitosana que é um polissacarídeo natural, linear, derivado da quitina que pode ser total ou parcialmente desacetilado<sup>2</sup>. Suas propriedades biológicas incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana, não toxicidade, não imunogenicidade, analgesia e atuando no reparo tecidual<sup>3</sup>.

A quitosana é um dos biomateriais mais usados em pele e sua aplicação é aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Ela promove a infiltração de células polimorfonucleares e estimula fortemente a proliferação de fibroblastos, auxiliando o processo de cicatrização de feridas<sup>4</sup>. Devido à sua estrutura, é usada para liberação de biofármacos e também de moléculas bioativas, como Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos (FGF) e Fator de Crescimento Epidérmico Humano (EGF)<sup>5</sup>; e devido à sua biodegradação lenta e contínua, drogas sintéticas e vegetais são incorporadas para atuarem no reparo tecidual, hemostasia, analgesia e outras propriedades inerentes às mesmas<sup>6</sup>.

Historicamente as plantas foram bastante utilizadas como fontes medicamentosas no tratamento de diversas doenças e afecções em humanos e a animais<sup>7</sup>. Uma das plantas utilizadas na cura de abscessos, inflamação e hemorragia é a *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis, pertencente à família Vitaceae e difundida popularmente pelo nome de “Insulina”<sup>8</sup>. O seu desempenho como cicatrizante em ensaios pré-clínicos com coelhos mostrou-se uma potencial alternativa terapêutica no tratamento de reparação de feridas na pele<sup>9,10</sup>.

Concomitantemente, vários estudos farmacológicos de ação hipoglicemiante e antilipêmico têm sido realizados com extratos fluidos, decocto, infuso e extrato aquoso de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis, em ratos normais e diabéticos, tanto de forma aguda como crônica, verificando-se a diminuição da glicemia e dos triglicerídeos nos mesmos<sup>11,12</sup>.

Dessa forma, e em virtude das evidências supracitadas, buscou-se realizar testes *in vivo* de membranas de quitosana com e sem incorporação de extrato de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis, a fim de avaliar o processo de cicatrização tecidual mediado pelas

mesmas, tendo em vista a possibilidade de uso de um novo biomaterial com tecnologia e materiais nacionais.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

As membranas foram obtidas pela técnica de evaporação do solvente, e para o preparo da solução foi empregada a quitosana de média massa molecular com grau de desacetilação alcalina de 90%, produzida pelo Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO).

O extrato alcóolico bruto (EAB) de *Cissus verticillata* (L.), utilizado para a produção das membranas de quitosana foi cedido pela professora do curso de Odontologia da UFCG – CSTR, Rosana Araújo Rosendo, tendo sido as folhas obtidas no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarmM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A fim de identificar botanicamente a espécie vegetal utilizada no estudo, foram confeccionadas exsicatas, as quais foram depositadas no Herbário CSTR, localizado no Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR/UFCG), sob número de tombo – CSTR 5170.

As concentrações de 5% e 20% da droga vegetal foram selecionadas tomando como base os estudos desenvolvidos por Rosendo (2009) que utilizou 1,0 grama de pó das folhas de *Cissus verticillata* (L.) em pacientes, sendo essa dosagem considerada ideal para ser empregada pela população como terapêutica. Assim sendo, dissolveu-se 5% e 20% da droga vegetal em 250 mL da solução de quitosana. O processo de neutralização das membranas foi realizado utilizando a solução de hidróxido de amônio 28-30% P.A., massa molar 35,05 g/mol. Formaram-se três grupos de membranas: Quitosana (MQ 0%), Quitosana + 5% de EAB (MQ 5%) e Quitosana + 20% de EAB (MQ 20%) (Figura 4).

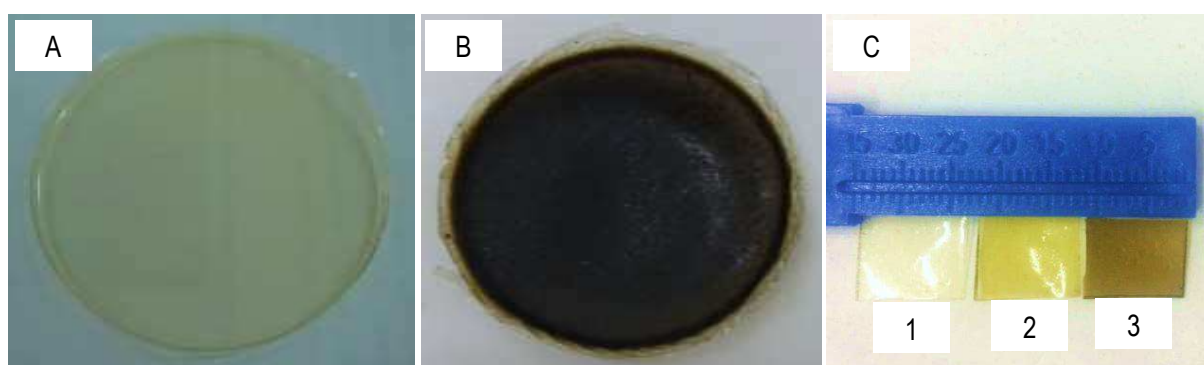


Figura 4: Membranas de quitosana sem/com extrato vegetal. Fonte: AUTOR/UFCG.

Visão Macroscópica das membranas. Visão Superior da MQ 0% (A). Visão Superior da MQ 20% (B). À medida que a droga vegetal foi incorporada em diferentes concentrações, as membranas tornaram-se esverdeadas, assumindo a coloração da droga vegetal. Adaptada (Rosendo, 2016). Membranas cortadas com área de 1,00cm<sup>2</sup> para implantação nos animais, C1: MQ 0%, C2: MQ 5% e C3: MQ 20% (C).

Tendo sido realizados os experimentos de biocompatibilidade das membranas de quitosana com e sem incorporação de extrato da planta *Cissus verticillata* (L.), em 60 ratos, machos, da linhagem Wistar, pesando entre 250 e 300 g, divididos em quatro grupos, sendo estes: controle; membrana de quitosana; membrana de quitosana com 5% e com 20% de extrato vegetal, e sob aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais sob protocolo CEP/CEUA n° 068-2017; os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Bioensaios (LBio), Campus de Patos da UFCG.

O processo cirúrgico aconteceu inicialmente com anestesia por injeção intraperitoneal da mistura de cloridrato de cetamina (Ketamin<sup>®</sup>) (100mg / kg), cloridrato de xilazina (Calmium<sup>®</sup>) (10mg / kg) e cloreto de sódio a 0,9% (Figura 5).



Figura 5: Anestesia por injeção intraperitoneal. Fonte: AUTOR/UFCG

Em seguida foi realizada a antissepsia com clorexidina 0,2% e tricotomia da região do dorso direito do rato, sob o músculo dorsal. Os animais receberam anestesia local por infiltração anestésica subcutânea com cloridrato de lidocaína a 2% e noradrenalina a 1: 50.000 (Lidostesim 2%, Probem<sup>®</sup>), para obter hemostasia e analgesia adicional durante a cirurgia, além de controle da dor imediatamente no pós-operatório. Uma incisão de aproximadamente 15 mm de

comprimento foi realizada na pele e fáscia muscular com lâmina de bisturi número 15 com posterior divulsão dos tecidos. Cada loja cirúrgica foi preenchida com o biomaterial com área de 1,00 cm<sup>2</sup> (Figura 6).



Figura 6: Incisão de aproximadamente 15 mm de comprimento, realizada na pele e fáscia muscular do animal e introdução do biomaterial na loja cirúrgica. Fonte: AUTOR/UFSC

Realizou-se a síntese da ferida dorsal com dois pontos simples mononylon 5-0 (Figura 7).



Figura 7: Síntese da ferida dorsal com pontos simples mononylon 5-0. Fonte: AUTOR/UFSC

Posteriormente, os ratos foram medicados com duas gotas do analgésico Dipirona Sódica 500 mg/mL. Foram realizados os mesmos procedimentos para os grupos MQ 0%, MQ 5% e MQ 20% com exceção do Grupo Controle, no qual não foi realizada a implantação de nenhuma membrana, apenas criação da loja cirúrgica e sutura simples.

Ao final do 7º, 15º e 30º dia, os animais foram eutanasiados com solução de cloridrato de cetamina (Ketamin®) (100mg / kg) e cloridrato de xilazina (Calmun®) (10mg / kg), via intraperitoneal, seguindo o protocolo de eutanásia da Universidade do Oeste de Santa Catarina.

Depois foi realizada a técnica de deslocamento cervical de acordo com o AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals 2013, Ed.16. A comprovação da eutanásia ocorreu pela ausência de reflexos palpebrais, movimentos torácicos e batimentos cardíacos durante três minutos. Posteriormente, foi realizada a remoção em bloco das amostras do tecido cicatricial com uma margem de segurança de 5 mm, a partir das bordas da área de cicatrização (área de aproximadamente de 2 cm<sup>2</sup>).

As peças biopsiadas permaneceram em formol a 10% por sete dias e, na sequência, foram encaminhadas para clivagem e preparação das lâminas histológicas no laboratório de Patologia do Hospital Universitário Veterinário Professor Ivon Macêdo Tabosa - CSTR/UFCG, empregando-se o corante Tricrômico de Masson.

Foram avaliados os seguintes eventos, a partir dos escores estabelecidos: cicatrização (0 = deiscência; 1 = parcial; 2 = completa); vascularização (0 = ausente; 1 = leve/moderada; 2 = intensa); edema (0 = ausente; 1 = leve/moderado; 2 = intenso); necrose (0 = ausente; 1 = presente); infiltrado inflamatório (0 = ausente; 1 = leve/moderado; 2 = intenso); células gigantes tipo corpo estranho (0 = ausente; 1 = presente); percentual de colagenização (0 = ausente; 1 = leve/moderado; 2 = intenso); intensidade de coloração (0 = ausente; 1 = leve/moderado; 2 = intenso).

A seguir os dados foram analisados no programa estatístico GraphPad Prism version 5.0 (San Diego, CA, USA). O método estatístico foi escolhido com base no modelo de distribuição e variância dos dados avaliados pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente.

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 EXAME MACROSCÓPICO:**

Nos tempos preestabelecidos de 7, 15 e 30 dias, as feridas cirúrgicas se apresentaram, clinicamente, com boa evolução, sem sinais de infecção, edema e/ou secreção purulenta em todos os grupos.

#### **3.2 EXAME MICROSCÓPICO:**

As análises das lâminas histológicas coradas em Tricrômico de Masson determinaram presença/ausência dos eventos inerentes à cicatrização tecidual e a intensidade dos mesmos (Figura 8).

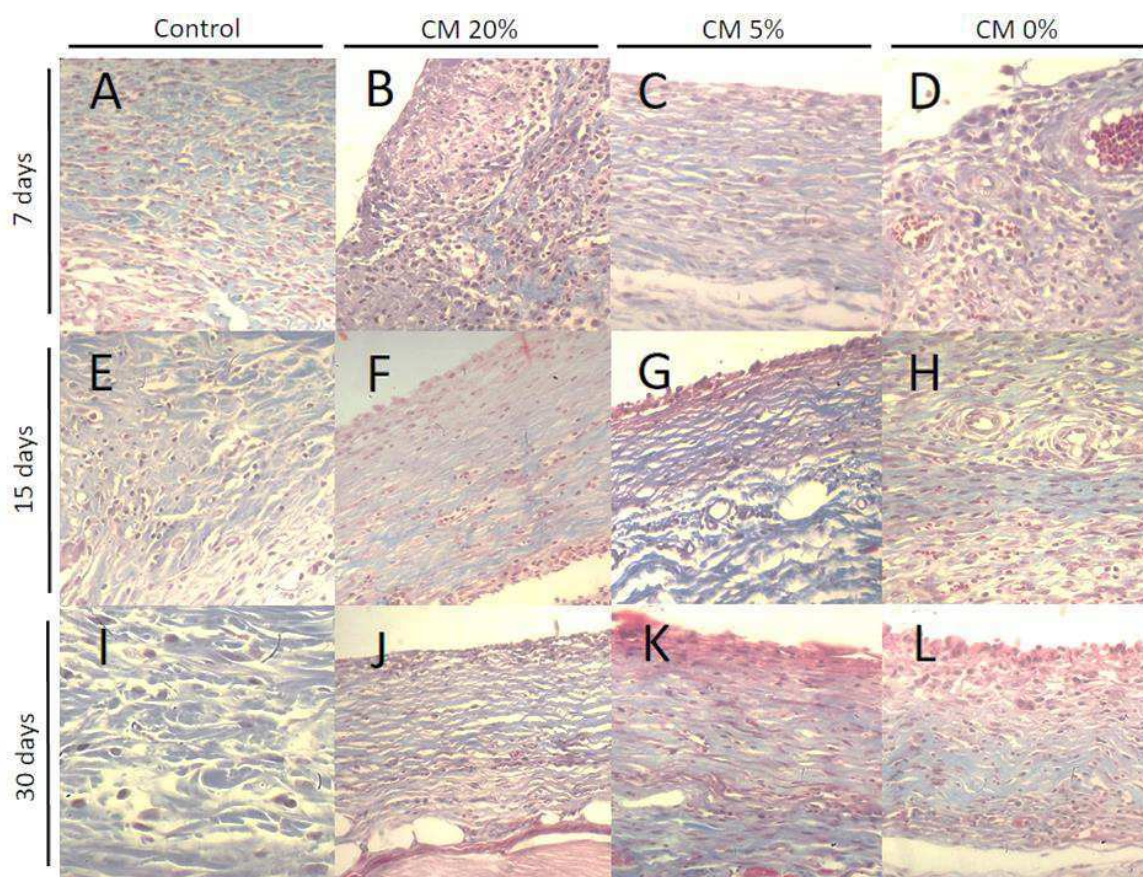


Figura 8 – Percentual e intensidade de fibroplasia das amostras por meio da técnica histoquímica do Tricrômico de Masson. O nível de produção de fibras colágenas (áreas coradas em azul nas imagens) apresentou relação direta com o número de dias do experimento e indireta com a vascularização e infiltrado inflamatório encontrados nos espécimes. Embora não tenham sido encontradas diferenças estatisticamente significativas, a membrana de quitosana associada ao extrato de *Cissus verticillata* a 5% (C, G e K) parece ter demonstrado maior nível de fibrose com menores índices de inflamação e vascularização quando comparado aos outros grupos. (Tricrômico de Masson, 40x).

### 3.2.1 Infiltrado Inflamatório

Em 7 dias, os grupos MQ 0% e MQ 5% apresentaram infiltrado inflamatório intenso comparado ao controle, já o grupo MQ 20% mostrou infiltrado inflamatório leve/moderado. No tempo de 15 dias, apenas o grupo MQ 0% apresentou infiltrado inflamatório leve/moderado quando comparado ao Controle. E em 30 dias esse evento foi ausente em todos os grupos.

### 3.2.2 Edema, Necrose Tecidual e Células do tipo Corpo Estranho

Com 7 dias, apenas o grupo MQ 5% apresentou edema leve/moderado em relação ao Controle; nos demais grupos o evento foi ausente. Em 15 e 30 dias houve ausência de edema



em todos os grupos avaliados em relação ao grupo Controle. Em todos os tempos avaliados nenhum grupo apresentou necrose de tecido. E houve ausência de células gigantes em todos os grupos avaliados nos tempos preestabelecidos.

### 3.2.3 Vascularização

Os grupos MQ 0% e MQ 5%, em 7 dias, mostraram vascularização leve/moderada comparativamente ao Controle e, o grupo MQ 20% apresentou ausência de vascularização. No tempo de 15 dias, apenas o grupo MQ 5% exibiu evento vascular leve/moderado em relação ao grupo Controle e, nos demais grupos avaliados, este evento foi ausente. Já no tempo de 30 dias, nenhum grupo estudado apresentou eventos vasculares, quando comparados ao grupo Controle.

### 3.2.4 Cicatrização

No tempo de 7 dias, os grupos MQ 0% e MQ 20% apresentaram cicatrização completa comparativamente ao Controle; já o grupo MQ 5% teve cicatrização leve/moderada. E nos tempos de 15 e 30 dias, todos os grupos estudados apresentaram processo cicatricial completo em relação ao Controle.

### 3.2.5 Fibras Colágenas

Em 7 dias, o grupo MQ 0% apresentou leve/moderada fibroplasia e o grupo MQ 20% mostrou grau intenso do mesmo evento em relação ao Controle. No tempo de 15 dias, os grupos MQ 0% e MQ 20% apresentaram leve/moderada proliferação fibroblástica e o grupo MQ 5% intensidade deste evento. Já em 30 dias, os grupos MQ 0% e MQ 5% apresentaram intensa fibroplasia comparativamente ao Controle e o grupo MQ 20% apresentou intensidade leve/moderado.

### 3.2.6 Intensidade de Coloração das Fibras

Com 7 dias, o grupo MQ 0% mostrou intensidade de coloração das fibras colágenas leve/moderada e o grupo MQ 20% intensa coloração em relação ao Controle. Já em 15 dias, todos os grupos apresentaram intensidade de coloração considerada leve/moderada. E em 30

dias, MQ 0% e MQ 5% mostraram coloração intensa das fibras, ao passo que, MQ 20% mostrou leve/moderada intensidade de coloração.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos eventos celulares não apresentaram distribuição normal, portanto, foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para determinar as diferenças entre os grupos ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1).

Condição Tempo/Dias	Grupos				P*
	MQ0	MQ5	MQ20	C	
<b>Infiltrado Inflamatório</b>					
7	13.00 <sup>AB</sup>	16.00 <sup>A</sup>	5.00 <sup>B</sup>	14.00 <sup>A</sup>	0.006
15	8.00	6.00	5.00	5.00	0.068
30	5.00	5.00	5.00	5.00	1.000
<b>Edema</b>					
7	6.00	10.00	5.00	7.00	0.381
15	5.00	5.00	5.00	5.00	1.000
30	5.00	5.00	5.00	5.00	1.000
<b>Necrose</b>					
7	5.00	6.00	5.00	5.00	0.391
15	5.00	5.00	5.00	5.00	1.000
30	5.00	5.00	5.00	5.00	1.000
<b>Vascularização</b>					
7	8.00 <sup>AB</sup>	10.00 <sup>AB</sup>	5.00 <sup>A</sup>	14.00 <sup>B</sup>	0.028
15	5.00	7.00	6.00	5.00	0.251
30	5.00	5.00	5.00	6.00	0.391
<b>Células gigantes multinucleadas</b>					
7	7.00	6.00	5.00	5.00	0.251
15	5.00	5.00	5.00	5.00	1.000
30	5.00	5.00	5.00	5.00	1.000
<b>Cicatrização</b>					
7	20.00 <sup>A</sup>	11.00 <sup>B</sup>	20.00 <sup>A</sup>	20.00 <sup>A</sup>	0.001
15	20.00	20.00	20.00	20.00	1.000
30	20.00	20.00	20.00	20.00	1.000
<b>Fibras Colágenas</b>					
7	9.00 <sup>AB</sup>	7.00 <sup>A</sup>	16.00 <sup>B</sup>	5.00 <sup>A</sup>	0.003
15	15.00	16.00	18.00	18.00	0.130
30	18.00	18.00	20.00	18.00	0.437
<b>Intensidade da Coloração de Colágeno</b>					
7	9.00 <sup>AB</sup>	7.00 <sup>A</sup>	16.00 <sup>B</sup>	5.00 <sup>A</sup>	0.003
15	15.00	16.00	18.00	18.00	0.130
30	18.00	18.00	20.00	18.00	0.437

Tabela 1 – Média dos escores atribuídos às membranas, após os intervalos de tempo de 7, 15 e 30 dias, para as oito condições avaliadas.

<sup>a</sup> Para cada amostra do estudo, cinco cortes representativos da condição histológica do tecido foram analisados, quando todos os cinco cortes do tecido apresentavam a mesma condição histológica, indicava as pontuações: 1, ausente (5,00); 2, escasso (10,00); 3, moderado (15,00); e 4, intenso (20,00).

\**P* indica teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. <sup>A</sup> ou <sup>B</sup> Médias seguidas pela mesma letra não expressam diferença estatisticamente significativa ( $P>0,05$ ). <sup>AB</sup> Médias seguidas por letras diferentes expressam diferença estatisticamente significativa ( $P<0,05$ ).

A presença do infiltrado inflamatório demonstrou-se mais intenso nos grupos MQ 0%, MQ 5% e Controle, sendo significativamente maiores quando comparado ao grupo MQ 20% ( $P=0.006$ ) no período de tempo de 7 dias (Figura 9). Nos períodos subsequentes de 15 e 30 dias ocorreu uma diminuição da presença de infiltrado inflamatório semelhante entre os grupos ( $P>0.05$ ).

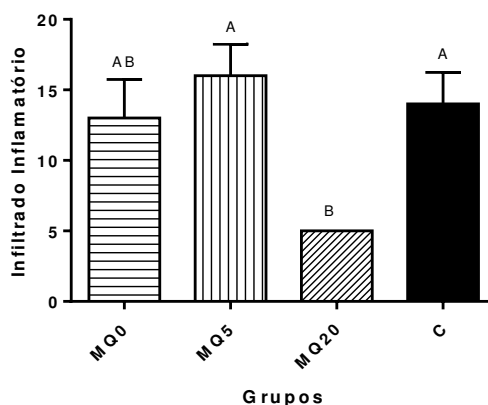


Figura 9 – Intensidade do infiltrado inflamatório no período de tempo de 7 dias.

A vascularização tecidual demonstrou-se mais presente no grupo Controle que apresentou diferença significativa com o grupo MQ 20% no período de tempo de 7 dias ( $P=0.028$ ) (Figura 10). Nos períodos de tempo de 15 e 30 dias, ocorreu uma diminuição gradativa da vascularização, sem diferença significativa entre os grupos ( $P>0.05$ ).

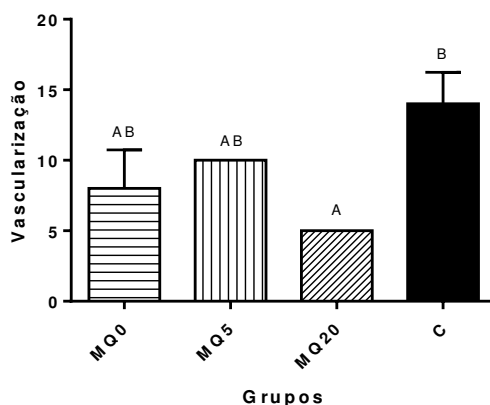


Figura 10 – Presença de vascularização no período de tempo de 7 dias.

O processo de cicatrização foi observado considerando o fechamento da ferida em ausente (deiscência), escasso (parcial), moderado (incompleto) e intenso (completo). A cicatrização foi significativamente menor apenas no grupo MQ 5% comparado aos outros grupos no período de tempo de 7 dias ( $P=0.001$ ) (Figura 11).

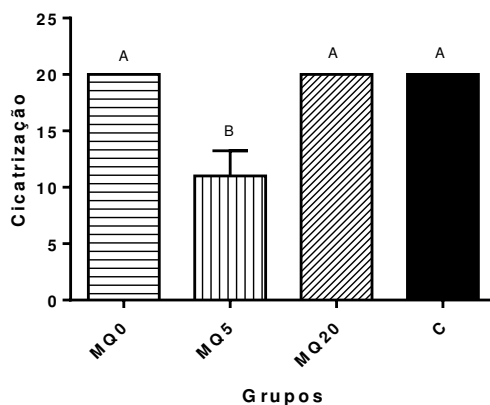


Figura 11 – Processo de cicatrização no período de tempo de 7 dias.

A presença de fibras colágenas e a intensidade da coloração do colágeno demonstraram ser tempo-dependente. O grupo MQ 20% apresentou uma quantidade maior de colagenização e maturação das fibras colágenas comparado aos outros grupos avaliados com diferença significativa comparado aos grupos MQ 5% e Controle no período de tempo de 7 dias ( $P=0.003$ ), diferença não observada nos períodos de tempo subsequentes ( $P>0.05$ ) (Figuras 12 e 13).

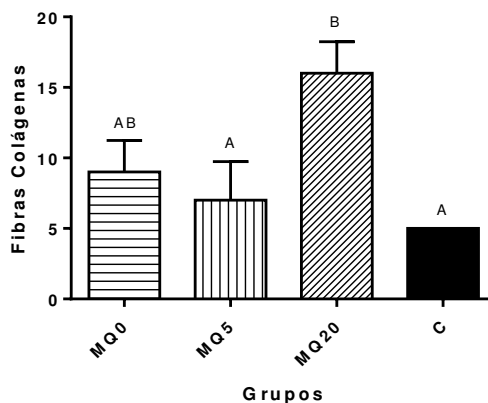


Figura 12 – Quantidade de fibras colágenas no período de tempo de 7 dias.

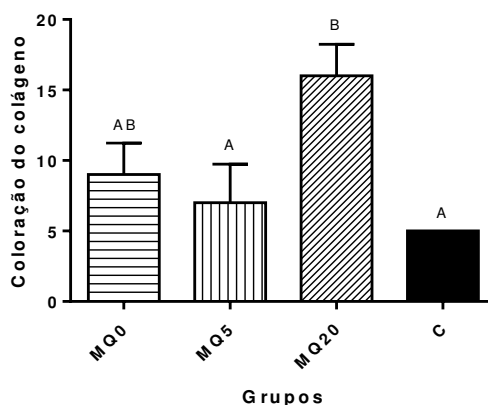


Figura 13 – Intensidade da coloração do colágeno no período de tempo de 7 dias.

Eventos celulares de edema, necrose e células gigantes multinucleadas foram observados apenas no período de tempo de 7 dias, e foram pouco expressivos entre os grupos sem demonstrar diferença estatisticamente significante ( $P > 0.05$ ).

#### 4 DISCUSSÃO

A quitosana, a partir de suas propriedades biológicas, físicas e químicas, assim como, a espécie vegetal *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis com seu potencial terapêutico são amplamente abordadas na literatura, porém, separadamente. No entanto, não foram encontrados estudos publicados na comunidade científica avaliando o emprego do complexo polieletrólítico e seu potencial cicatricial *in vivo*.

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico que consiste sinteticamente em cinco fases, incluindo hemostasia, inflamação, migração, proliferação e maturação que são cascatas

sequenciais e sobrepostas<sup>13</sup>. A quitosana pode melhorar a reparação de feridas, estimulando neutrófilos, macrófagos, osteoblastos e fibroblastos em diferentes estágios<sup>14</sup>. Seu uso pode resultar em uma modulação inflamatória e maior fibroplasia, aumentando assim, a produção de fibras colágenas<sup>14,15,13</sup>. Portanto, tem sido bastante usada em combinação com outros materiais para acelerar a formação de tecido de granulação, especialmente, no reparo de feridas cutâneas<sup>16,17,18,13,19,20</sup>.

O recrutamento celular para o tecido lesado durante a fase de inflamação é extremamente importante para remover detritos, células mortas e tecido necrótico resultante. Os neutrófilos são atraídos para a ferida por gradientes quimiotáticos, que liberam enzimas, como mieloperoxidases que digerem os resíduos celulares e contribuem para a morte de bactérias por fagocitose, formando um infiltrado inflamatório<sup>7</sup>.

Os resultados encontrados indicaram que em 7 dias os grupos MQ 0% e MQ 5% apresentaram reação inflamatória intensa, quando comparados ao Controle, corroborando com os estudos de Wang et al.<sup>21</sup> e Caetano et al.<sup>7</sup> que avaliaram membranas de quitosana/alginato *in vivo* com a finalidade de analisar cicatrização, obtendo resultados semelhantes no mesmo período de tempo estabelecido. Entretanto, confrontando os grupos entre si, MQ 5% apresentou maior indução de infiltrado inflamatório em relação ao Controle, e o grupo MQ 20% exibiu menor intensidade deste evento, em comparação tanto ao Controle quanto aos demais grupos.

Já em 15 e 30 dias, houve diminuição na intensidade da inflamação, coadunando-se com os estudos de Xu et al.<sup>22</sup>, que empregando membranas de carboximetilquitosana em coelhos observaram um significativo declínio, após o 15º dia da ação inflamatória na área de implantação do biomaterial.

Ojeh et al.<sup>23</sup> indicaram que neutrófilos são células responsáveis por iniciar e modificar o processo inflamatório agudo, por fagocitar e eliminar os microrganismos, e que com o decorrer do tempo, sucessões celulares e tissulares são capazes de alterar o estágio de agudização com aumento de macrófagos e, conseqüente, diminuição neutrofílica e de infiltrado. Respostas inflamatórias graves podem adiar o processo de cicatrização de feridas, atrasar reepitelização, reduzir formação de colágeno e bloquear a formação de novos vasos sanguíneos<sup>24,25</sup>.

Ressalta-se que Braga<sup>9</sup> verificou que a espécie vegetal *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis apresenta grandes concentrações de compostos fenólicos, flavonóides e rutina, sendo responsáveis por uma maior atividade antioxidante e anti-inflamatória em ação local. Assim, tanto a quitosana quanto os metabólitos secundários do vegetal são capazes de atuar na inflamação e eventos sucessivos da cascata de reparação tecidual.

Outro evento significativo para o processo de cicatrização é a formação de vasos sanguíneos que garante a entrega de oxigênio e de nutrientes para apoiar a atividade celular e regular o microambiente do tecido danificado<sup>26,27</sup>. O número de novos vasos representa um indicador vital para avaliar o efeito de reparo do tecido<sup>28</sup>.

Os resultados obtidos apontaram para uma diferença significativa entre o Controle e o grupo MQ 20% no período de tempo de 7 dias ( $P=0.028$ ), cujos eventos angiogênicos foram pouco expressivos na membrana de quitosana com maior concentração de extrato vegetal, porém em MQ 0% e MQ 5% a vascularização foi leve/moderado; e em 15 e 30 dias ocorreram diminuições gradativas dos eventos vasculares, sem diferença significativa entre os grupos ( $P>0.05$ ).

A redução da vascularização foi observada em estudos *in vitro* por Kim et al.<sup>29</sup> que constataram a presença de compostos flavonóides, conhecidos como inibidores de angiogênese, sendo estes derivados de fontes naturais, e presentes na planta *Cissus verticillata* (L.), como fator desencadeador do processo de inibição de novos vasos, com conseqüente retardo à formação do tecido de granulação, dificultando o reparo mais acelerado; além de que outros compostos químicos, com ação inibitória dos efeitos vasculares, também foram descritos em seu estudo, como por exemplo, o  $\beta$ -sitosterol, o resveratrol e a quercetina<sup>30,31</sup>.

Também, Yao et al.<sup>32</sup> avaliando *scaffolds* de quitosana/genipina/SDF-1 na cicatrização de feridas *in vivo*, constataram que após o 4º dia de experimento, a vascularização foi diminuindo significativamente nos grupos avaliados em relação ao Controle, corroborando com os resultados encontrados neste estudo. Já Caetano et al.<sup>7</sup> avaliando membranas de quitosana/alginato para fins de reparo, constataram que vascularização até o 7º dia foi significativa, sendo caracterizada por expressivo tecido de granulação, bem como, foi mantida e com alta densidade entre 14 e 21 dias, divergindo dos resultados encontrados neste estudo.

A migração de fibroblastos para a ferida é um fenômeno vital no reparo do tecido lesado, devido ao fato de que, são os principais responsáveis pela produção de colágeno<sup>28</sup>. A participação da quitosana permite a catalisação do processo de ativação plaquetária na fase inflamatória, o que gera aumento na formação de tecido granular, incluindo indução fibroblástica e formação vascular pela proliferação de células mesenquimais e endoteliais, agindo na modulação da cascata de reparo do tecido<sup>33,9,34,35,36</sup>.

Os resultados encontrados indicaram que a porcentagem de fibras colágenas e a intensidade da coloração das fibras são tempo-dependentes. O grupo MQ 20% apresentou uma quantidade maior de colagenização e maturação de fibras comparativamente aos demais grupos avaliados, com diferença significativa em relação à MQ 5% e ao grupo Controle no período de

tempo de 7 dias ( $P=0.003$ ), sendo que essa diferença não pode ser observada nos demais períodos de tempo avaliados ( $P>0.05$ ).

Em 15 dias, os grupos Controle e MQ 20% indicaram comportamentos estatísticos semelhantes, com fibroplasia e coloração intensas; e em 30 dias os grupos MQ 0% e MQ 5% apresentaram resultados semelhantes ao Controle, com MQ 20% indicando, estatisticamente, maior porcentagem de colagenização e intensidade de coloração das fibras. Denotando-se, portanto, a existência de uma relação entre a concentração de droga vegetal e a deposição colagenosa, porém sem ser possível estabelecer os limites de atuação, isolada e/ou em conjunto, da quitosana e do extrato de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis.

Quanto à área cicatricial, foi considerado como critério de avaliação o fechamento da ferida, podendo ser: ausente (deiscência), escasso (parcial), moderado (incompleto) e intenso (completo). Assim, observou-se que foi significativamente menor para o grupo MQ 5% comparativamente aos demais grupos de 7 dias ( $P=0.001$ ). Já nos tempos de 15 e 30 dias, todos os grupos mostraram, estatisticamente, comportamento semelhante ao controle, com fechamento completo da ferida.

Os resultados obtidos corroboram com os achados de Hao et al.<sup>28</sup> que avaliaram o potencial cicatricial de filmes de quitosana/alginato/fucoidan em animais roedores e, detectaram que até o 9º dia de reparo, a ação cicatricial dos filmes foi leve/moderada, e que o processo foi bem sucedido nos tempos subsequentes até o 21º dia, com as bordas da ferida totalmente fechadas, sem nenhum edema e infecção secundária.

Outro estudo avaliando membrana de quitosana, no qual se analisou sua eficácia como biomaterial para cobertura de ferida cutânea *in vivo*, os resultados apresentaram uma rápida hemostasia e cicatrização, revelando altas taxas de reepitelização e deposição de colágeno na derme em tempos mais avançados do reparo<sup>37</sup>. Por conseguinte, infere-se que o extrato vegetal, especialmente na concentração 20%, associada à quitosana, pode ter atuado, a partir de suas propriedades biológicas, na formação de tecido crostoso e, conseqüente, reepitelização.

Quanto aos eventos de edema, necrose e células gigantes multinucleadas foram constatados, apenas, no período de tempo de 7 dias, sendo pouco expressivos entre os grupos sem demonstrar diferença estatisticamente significativa ( $P>0.05$ ).

## 5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados neste estudo, denota-se que as membranas de quitosana e o extrato vegetal de *Cissus verticillata* (L.) desempenharam significativa



participação no processo de reparação tecidual, seja estimulando ou inibindo eventos biológicos.

Destaca-se, por conseguinte, a MQ 20% que apresentou cicatrização completa no tempo de 7 dias, infiltrado inflamatório leve/moderado, no mesmo período, com fibroblastos estimulados prematuramente e de forma contínua, colaborando para uma formação expressiva de colágeno, assim como, maturação das fibras colagenosas.

Desse modo, conclui-se que as membranas de Quitosana/ *C. verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis atuaram na modulação da fase inflamatória, estimulando a proliferação de fibroblastos, reepitelização e deposição colagenosa, sendo consideradas promissoras para o uso em feridas cutâneas, pelo seu potencial cicatricial.

## **6 AGRADECIMENTOS**

Ao CERTBIO (Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste) que possibilitou o desenvolvimento e caracterização das membranas; ao LBIO (Laboratório de Bioensaios) por proporcionar a execução do estudo; ao departamento de patologia do Hospital Veterinário Universitário Professor Ivon Macêdo Tabosa, pelo processamento das biópsias e confecção das lâminas histológicas; ao Professor George João Ferreira do Nascimento pela avaliação histológica das lâminas; ao Professor Rogério Lacerda dos Santos, pela análise estatística; ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa através do PIBIC (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica); e, especialmente, à Professora Rosana Araújo Rosendo, pela orientação da pesquisa e transmissão de conhecimentos.

## REFERÊNCIAS

- [1] Bergmann CP, Stumpf A. Dental Ceramics: Microstructure, Properties and Degradation. Biomaterials. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [2] WASUPALLI GK, VERMA D. Molecular interactions in self-assembled nano-structures of chitosan-sodium alginate-based polyelectrolyte complexes. International Journal of Biological Macromolecules. 2018; 114: 10-17.
- [3] Rosendo RA. Desenvolvimento e caracterização de scaffolds de quitosana / *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis. [Tese] Campina Grande: Federal University of Campina Grande; 2016.
- [4] Georgopoulou A, Kaliva M, Vamvakaki M; Chatzinikolaidou M. Osteogenic Potential of Pre-Osteoblastic Cells on a Chitosan-graft-Polycaprolactone Copolymer. Materials (Basel, Switzerland). 2018; 11 (4).
- [5] Momeni M, Zarehaghghi M, Hajimiri M, Khorasani G, Dinarv R, Nekookar A, Sodeifi N, Khosravani P, Shayanasl N, Ebrahimi M. In vitro and in vivo investigation of a novel amniotic-based chitosan dressing for wound healing. Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2018; 26 (1): 87-101.
- [6] Jennings JA, Bumgardner JD. Chitosan Based Biomaterials, Tissue Engineering and Therapeutics. United Kingdom: Woodhead Publishing; eds. 2, 2016.
- [7] Caetano GF, Frade MA, Andrade TA, Leite MN, Bueno CZ, Moraes ÂM, Ribeiro-Paes JT. Chitosan alginate membranes accelerate wound healing. Journal of Biomedical Materials Research. 2014; 103 (5): 1013-1022.
- [8] Drobnik, J, De Oliveira AB. *Cissus verticillata* (L.) Nicolson and C.E. Jarvis (Vitaceae): Its identification and usage in the sources from 16th to 19th century. Journal of Ethnopharmacology. 2015; 171: 317-329
- [9] Braga TV. Avaliação da atividade farmacológica de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & CE Jarvis como antioxidante, antifúngico, hipoglicemiante e cicatrizante. [Dissertation] Ouro Preto, Federal University of Ouro Preto, 2008.
- [10] Miller AB, Cates RG, Lawrence M. Soria JA, Espinoza LV, Martinez JV, Arbizú DA. Atividade antibacteriana e antifúngica de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais da Guatemala. Biologia Farmacêutica. 2015 3 de abril; 53 (4): 548-54.
- [11] BRAGANÇA LAR. Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar. Niterói - Rio de Janeiro: Editora da Universidade Federal Fluminense.1996; 300.

- [12] Lizama RS, Martinez MM, Perez OC. Contribución al estudio de *Cissus sicyoides* L. (bejuco ubí). *Revista Cubana de Farmacia*. 2000; 34 (2): 120-124.
- [13] Archana D, Singh BK, Dutta J, Dutta, P. Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: in vitro and in vivo evaluation. *Internacional Journal Biological Macromolecules*. 2015; 73: 49-57.
- [14] Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2011; 9 (7): 857-879.
- [15] Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2014; 9: 18.
- [16] Aoyagi S, Onishi H, Machida Y. Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007; 330: 138-145.
- [17] Muzzarelli RA, Morganti P, Morganti G, Palombo P, Palombo M, Biagini G, Belmonte MM, Giantomassi F, Orlandi F, Muzzarelli C. Chitin nanofibrils/chitosan glycolate composites as wound medicaments. *Carbohydrate Polymers*. 2007; 70: 274-284.
- [18] Fouda MM, Wittke R, Knittel D, Schollmeyer E. Use of chitosan/polyamine biopolymers based cotton as a model system to prepare antimicrobial wound dressing. *International Journal of Diabetes Mellitus*. 2009; 1: 61-64.
- [19] Lu B, Wang T, Li Z, Dai F, Lv L, Tang F, Yu K, Liu J, Lan G. Healing of skin wounds with a chitosan-gelatin sponge loaded with tannins and platelet-rich plasma. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016; 82: 884-891.
- [20] Mahmoud AA, Salama AH. Norfloxacin-loaded collagen/chitosan scaffolds for skin reconstruction: preparation, evaluation and in-vivo wound healing assessment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016; 83:155-165.
- [21] Wang L, Khor E, Wee A, Lim LY. Chitosan-alginate PEC membrane as wound dressing: assessment of incisional wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002; 63: 610-618.
- [22] Xu W, Wang Z, Liu Y, Wang L, Jiang Z, Li T, Zhang W, Liang Y. Carboxymethyl chitosan/gelatin/hyaluronic acid blended-membranes as epithelia transplanting scaffold for corneal wound healing. *Carbohydrate Polymers*. 2018; 192: 240-50.

- [23] Ojeh N, Pastar I, Tomic-Canic M, Stojadinovic O. Stem cells in skin regeneration, wound healing, and their clinical applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16 (10): 25476-25501.
- [24] Gutiérrez-Fernández A, Inada M, Balbín M, Fueyo A, Pitiot AS, Astudillo A, Hirose K, Hirata M, Shapiro SD, Noël A. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). *FASEB Journal*. 2007; 21: 2580-2591.
- [25] Guo SA, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*. 2010; 89 (3): 219-229.
- [26] Johnson KE, Wilgus TA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair. *Advances in Wound Care*. 2010; 3 (10): 647-661.
- [27] Castano O, Pérez-Amodio S, Navarro-Requena C, Mateos-Timoneda MÁ, Engel E. Instructive microenvironments in skin wound healing: biomaterials as signal releasing platforms. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018; 129: 95-117.
- [28] Hao Y, Zhao W, Zhang L, Zeng X, Sun Z, Zhang D, Shen P, Li Z, Han Y, Li P, Zhou Q. Bio-multifunctional alginate/chitosan/fucoidan sponges with enhanced angiogenesis and hair follicle regeneration for promoting full-thickness wound healing. *Materials and Design*. 2020.193.
- [29] Kim YK, Guo Q, Packer L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology*. 2002; 172 (2): 149-156.
- [30] Quilez AM, Saenz MT, Garcia MD, De La Puerta R. Phytochemical analysis and antiallergic study of *Agave intermixta* Trel. And *Cissus sicyoides* L. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2004; 56 (9): 1185-1189.
- [31] Lucena FR, Almeida ER, Aguiar JS, Silva TG, Souza VM, Nascimento SC. Cytotoxic, antitumor and leukocyte migration activities of resveratrol and sitosterol present in the hidroalcoholic extract of *Cissus sicyoides* L., Vitaceae, leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010; 20 (5): 729-733.
- [32] Yao CH, Chene KY, Chenge MH, Chenb YS, Huangf CH. Effect of genipin crosslinked chitosan scaffolds containing SDF-1 on wound healing in a rat model. *Materials Science & Engineering*. 2020; 109: 368-378.
- [33] Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*. 2003; 23 (4): 519-534.
- [34] Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*. 2013; 49 (4): 780-792.

- [35] Rodríguez-Cruz IM, Merino V, Merino M, Díez O, Nácher A, Quintanar-Guerrero D. Polymeric nanospheres as strategy to increase the amount of triclosan retained in the skin: passive diffusion vs. iontophoresis. *Journal of Microencapsulation*. 2013; 30 (1): 72-80.
- [36] Caon T, Porto LC, Granada A, Tagliari MP, Silva MA, Simões CM, Borsali R, Soldi V. Chitosan-decorated polystyrene-b-poly (acrylic acid) polymersomes as novel carriers for topical delivery of finasteride. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014; 52: 165-172.
- [37] Mi FL, Shyu SS, Wu YB, Lee ST, Shyong JY, Huang RN. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials*. 2001; 22 (2): 165-173.

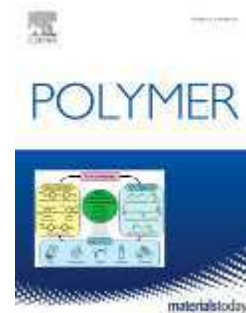
## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os biomateriais são importantes alternativas terapêuticas disponíveis para uso biomédico no reparo ou substituição de tecidos lesados. A quitosana é estudada há décadas e possui propriedades químicas e biológicas comprovadas na mediação da resposta inflamatória, reconstrução e remodelação tecidual; assim como, a *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E Jarvis possui funções sistêmicas importantes e já estudadas como redução da glicemia, controle de lipídeos e ação cicatrizante. Por conseguinte, as pesquisas com animais de laboratório tornam-se fundamentais para definir a viabilidade de um novo material e sua funcionalidade orgânica.

As membranas de Quitosana/ se apresentaram promissoras, especialmente como composto polieletrólítico, no processo de cicatrização tecidual. Porém, outros estudos que permitam analisar mais detalhadamente suas degradações, interações farmacológicas e celulares são imprescindíveis para garantir melhor aperfeiçoamento e aplicabilidade das mesmas.

## ANEXOS

### Anexo A – Normas para publicação



### NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

Please note that the instructions related to Units still apply to all new submissions.

### Nomenclature

Nomenclature should conform to current scientific usage. Author(s) should use systematic names similar to those used by Chemical Abstracts Service and the International Union of Pure and Applied Chemistry. Chemical Abstracts (CA) nomenclature rules can be found in Appendix IV of the Chemical Abstracts Index Guide.

#### *IUPAC Guidelines for Polymer Nomenclature*

Authors are invited to follow IUPAC recommendations for naming and drawing polymers. A two-page guide is available here: [http://www.iupac.org/nc/home/projects/project-db/project-details.html?tx\\_wfqbe\\_pi1%5Bproject\\_nr%5D=2008-032-1-400](http://www.iupac.org/nc/home/projects/project-db/project-details.html?tx_wfqbe_pi1%5Bproject_nr%5D=2008-032-1-400)

#### **Introduction**

For full-length manuscripts, a proper *introduction* is required. The purpose of the introduction is to briefly summarise previous work and recent progress in the field and not to repeat information found in previous publications. The introduction must be kept to a minimum length and only references that pertain to the information in the manuscript should be used. For shorter articles, introductions should be correspondingly brief.

The title should be concise, informative and representative of the contents of the manuscript.

#### **Abstract**

An abstract of approximately 100 to 150 words identifying the new and significant results of the study must be provided for all manuscripts, including articles, reviews, and communications. The abstract should comprise a brief and factual account of the contents and

conclusions of the paper as well as an indication of any new information presented and its relevance. Abstracts should be self-contained. References to formulae, equations or references that appear in the main text are not permissible.

### **Graphical Abstract**

**In addition to the Abstract, which will appear at the beginning of the text, the author should provide a graphical abstract (TOC). The TOC graphic should capture the reader's attention and, in conjunction with the manuscript title, should give the reader a quick visual impression of the essence of the paper. It should be in the form of a structure, graph, drawing, TEM/SEM/AFM micrograph, or reaction scheme without any added text. Tables or spectra are not acceptable. Color is encouraged. Type size of labels, formulas, or numbers within the graphic must be legible. The graphic should be submitted as a separate file in either TIFF, JPG, Word, or Powerpoint format.**

### ***Experimental***

The *experimental* section should provide sufficient detail of the materials, methods and equipment to allow repetition of the work elsewhere, but should not contain excessive detail of commonly used procedures. Precautions for handling dangerous material or for performing hazardous procedures should be explicitly stated.

### ***References***

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

### ***Formatting requirements***

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

### ***Figures and tables embedded in text***

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

### **Peer review**

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers



which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. More information on types of peer review.

## **REVISED SUBMISSIONS**

### ***Formatting of Revised Manuscripts***

In order to support the assessment of your revised manuscript in addition to providing a response to the referee comments, it is compulsory to highlight which parts of the manuscript have been amended as part of the revision. You can choose to do this by using red or a different colour of font for additional text, highlighting additional text in yellow or by listing the specific sections/pages of where the changes are made in your response to the referee comments.

### ***Supplementary data***

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Authors should be encouraged to submit their supplementary data in PDF format and include a note at the end of the manuscript with a link to the materials free of charge.

### ***Subdivision - unnumbered sections***

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply "the text".

The main text should include introduction, experimental section, results, discussion and conclusion. All footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. Headings and subheadings for different sections of the papers should be used and clearly identified. If each section needs to be numbered, a sequence such as 2., 2.1., 2.1.1., etc should be used. All tables and figures must be mentioned in the text. Trade names should have an initial capital letter.

### **Math formulae**

Detailed mathematical discussion should be placed in an appendix. Equations and formulae should be typewritten.

### ***Conclusions***

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section. Please note that the conclusions should not repeat the summary.

### ***Color artwork***

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

### ***Use of word processing software***

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### ***LaTeX***

You are recommended to use the [latest Elsevier article class](#) to prepare your manuscript and [BibTeX](#) to generate your bibliography. Our [Guidelines](#) has full details.

**Anexo B** - Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA do Centro de Saúde e Tecnologia Rural - CSTR/UFCG, da Universidade Federal de Campina Grande, Patos – Paraíba.

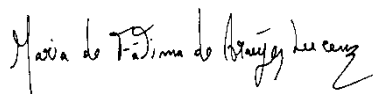
A: Prof. Dra. **Luanna Abílio Diniz Melquíades de Medeiros**

Protocolo CEP/CEUA nº068-2017

### **CERTIDÃO**


Certificamos a V.Sa. que seu projeto intitulado “**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE BIOMATERIAIS**” teve parecer consubstanciado orientado pelo regulamento interno deste comitê e foi **Aprovado**, em caráter de **Ad referendum**, estando à luz das normas e regulamentos vigentes no país atendidas as especificações para a pesquisa científica.

Patos, 21 de novembro de 2017.



Maria de Fátima de Araujo Lucena  
Coordenadora do CEP/CEUA/UFCG/Patos

## Anexo C – Protocolo para eutanásia de ratos da UNOESC.

	<b>UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA</b>			<b>POP nº 013</b>
	<b>Procedimento Operacional Padrão (POP)</b>			Versão nº 01
	Data de emissão	Data de Vigência	Próxima Revisão	Revisão nº- 0 Data _/ _/ _____
Etapa: Protocolo para eutanásia de ratos e camundongos.				
Responsáveis: funcionários, técnicos e pesquisadores envolvidos em atividades com animais.				
Elaboração:				
Aprovado por:			Data:	

**1. EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL (EPI):**

- Óculos de proteção;
- Máscara cirúrgica cobrindo a boca e nariz;
- Luva de látex;
- Jaleco de manga longa;
- Touca, que deve cobrir todos os cabelos.

**2. CONDIÇÕES PARA REALIZAÇÃO EUTANÁSIA NOS ANIMAIS**

- a) Os procedimentos devem ser realizados por pessoal treinado e capacitado;
- b) A eutanásia deve ser realizada em ambiente silencioso e longe de outros animais. A morte deve ser confirmada antes que o cadáver seja descartado;
- c) Sempre que possível, tecidos e estruturas do cadáver devem ser compartilhadas entre pesquisadores e professores, alinhando-se, dessa forma, ao princípio de Redução do uso de animais.

**3. PROTOCOLOS SUGERIDOS PARA EUTANÁSIA DE RATOS E CAMUNDONGOS:**

- **Protocolo 1** - Administração, por via intravenosa, de tiopental sobredosagem de 100mg/kg, confirmação da perda de consciência e morte.
- **Protocolo 2** - Administração, por via intraperitoneal de tiopental sobredosagem de 100mg/kg + lidocaína 10mg/ml, confirmação da perda de consciência e morte. **Protocolo 3** - Administração, por via intravenosa de, propomos sobredosagem de 60mg/kg, confirmação da perda de consciência e morte.
- **Protocolo 4** - Administração, por via intraperitoneal de sobredosagem de cetamina 300mg /kg + xilazina 30mg/kg, após confirmação da perda de consciência e morte.
- **Protocolo 6** – Método de eutanásia utilizando CO<sub>2</sub>, é aceito com restrições, e só poderá ser utilizado desde que sejam seguidas as recomendações das Diretrizes da Prática de Eutanásia do Concea.
- **Protocolo 7** – Anestesiando os animais com: tiopental ou quetamina + xilazina ou propofol, após a anestesia geral (confirmação da perda de consciência) administração de cloreto de potássio ou exsanguinação por punção cardíaca.

**OBSERVAÇÃO:**

- Acondicionar a carcaça em saco branco de resíduo biológico, seguindo o pop número 014 de descarte de resíduos.