

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CURSO: BACHARELADO EM ODONTOLOGIA**

RAFAEL RODRIGUES DE SIQUEIRA

**AVALIAÇÃO *In vivo* DA BIOCAMPATIBILIDADE DE MEMBRANAS DE
QUITOSANA / *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis**

**PATOS-PB
2018**

RAFAEL RODRIGUES DE SIQUEIRA

**AVALIAÇÃO *In vivo* DA BIOCAMPATIBILIDADE 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^a. Dr^a Rosana Araújo
Rosendo.

**PATOS-PB
2018**

S618a Siqueira, Rafael Rodrigues de.

Avaliação *In vivo* da biocompatibilidade de membranas de quitosana / *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis / Rafael Rodrigues de Siqueira. – Patos, 2018.

50 f.: il. color.

Monografia (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2018.

"Orientação: Prof.^a Dr.^a Rosana Araújo Rosendo".

Referências.

1. Ceratoconjuntivite Seca. 2. Oftalmopatia. 3. Teste Lacrimal de Shirmer. I. Rosendo, Rosana Araújo. II. Título.

CDU 616.314

RAFAEL RODRIGUES DE SIQUEIRA

AVALIAÇÃO *In vivo* DA BIOCAMPATIBILIDADE 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 4/12/18

BANCA EXAMINADORA

Rosana Araújo Rosendo,

Prof^ª. Dr^ª. Rosana Araújo Rosendo – Orientadora
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG

Luanna Abilio Diniz Melquiades de Medeiros.

Prof^ª. Dr^ª. Luanna Abilio Diniz Melquiades de Medeiros – 1^º Membro
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG

Elizandra S. da Penha

Prof. Msc. Elizandra Silva da Penha – 2^º Membro
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG

Dedico este trabalho aos meus pais por todo apoio fornecido ao longo da minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus, diariamente pedindo proteção, por ter derramado tantas bênçãos em minha vida mesmo sem merecer favor algum, pois sem Ele nada seria possível.

Agradeço aos meus pais, Sandro Roberto Braz de Siqueira e Gilvânia Rodrigues Pereira de Siqueira, que sempre batalharam para nunca faltar nada e me proporcionaram o melhor, me ensinaram que a minha fé e confiança devem estar depositada somente em Jesus Cristo. Aos meus irmãos Clara S. Siqueira, Luiza G. Rodrigues e Gilsânio R. Siqueira pelo companheirismo e carinho que sempre tiveram comigo.

A Maria do Carmo Siqueira, minha avó, por sempre me permitir sonhar e acreditar na minha pessoa, como também a todos os meus tios e primos que sempre se dispuseram em ajudar.

A família que a vida me deu Vitor Santos e Maria Helena e aos amigos que tenho a mais de uma década Rafaela Frazão, Davison, Andréia Reis e Sara Géssica.

Ao meu grande parceiro Fernando Medeiros Filho, que é para mim o melhor amigo e apoio em todos os momentos. Obrigado por estar sempre presente e disposto a me ajudar em tudo o que for preciso, me incentivando a conquistar meus sonhos, tendo paciência e me ajudando a enfrentar e enxergar a vida da melhor forma possível.

Minha amada UFCG, ao qual tenho grande carinho e orgulho de fazer parte, sendo esse o local que tive os mais importantes aprendizados para minha vida, onde conheci e criei vínculos com pessoas maravilhosas.

Pessoas como Laerte Cavalcante, Fernanda Rocha, Vanessa Gonçalves, Elaine Patrícia, André Rodrigo, Natália Rodrigues, Maria Vitória de Oliveira, Diobson Gonçalves, Maria Moraliza Gomes, Aristóteles Magalhães e Danilo Almeida que foram um dos melhores presentes que Deus me deu, amizade construída no decorrer desses anos na UFCG e que vou levar para toda vida.

Aos amigos que a milhares de quilômetros do nosso país tornaram minha família para todo o suporte que necessitei Juliene Aljahara, Moema Probo, Dan Freeman, Glenda Cledes e Amanda Fonseca.

A minha orientadora Rosana Araújo Rosendo, ao qual tenho grande admiração e respeito, sou muito grato pela oportunidade que me proporcionou, és um ser humano de grande coração e apaixonada pela profissão, meu espelho como profissional e pessoa. Agradeço também as

queridas professoras Luanna Abílio Diniz Melquíades de Medeiros e Elizandra Silva da Penha para quem tenho grande apreço e respeito. A família do LBio pelos momentos de felicidade, descoberta e aprendizado. Aos professores George Nascimento, Cyntia Helena, Ednaldo Queiroga e Julierme Ferreira pela oportunidade e confiança na minha pessoa, me permitindo fazer parte dos programas de extensões: LADO, LAC e Automedicação e seus Riscos, sem dúvida foram projetos que mudaram a minha visão de mundo como aluno e pessoa. Sempre grato ao Professor Ednaldo Queiroga por me orientar na iniciação científica, onde de fato desenvolvi o prazer pela pesquisa. Aos professores Vicente Queiroga, Marco Antônio e Andresa Costa pelos programas de monitoria, pelos projetos de pesquisa, bem como o apoio emocional e burocrático para que o meu sonho de intercâmbio fosse iniciado e concluído com sucesso. A todos os professores do curso de Odontologia da UFCG que sou grato pelos conhecimentos e valores transmitidos, que foram essenciais para a minha construção como pessoa e profissional.

Não posso deixar de agradecer alguns professores da *Roosevelt University*, que por quase dois anos, foram essenciais na minha formação acadêmica, em especial as professoras Susanne McLaughlin e Kelly Wentz e gratidão ao meu *advisor* Justin Osadjan por ser meu tutor.

Meu reconhecimento aos funcionários que compõem a equipe UFCG por todo carinho e ajuda durante todos esses anos, em especial Laninha, Vânia da clínica, Vânia da central de aula II, Damião, Diana, Neuma, Poliana, Soró, Messias e Edleuza. À Millena pelo tempo e dedicação das produções e leituras das lâminas histológicas assim como o Laboratório de Patologia do Hospital Veterinário da UFCG, Patos.

Aos pacientes que passaram em minhas mãos, obrigado por depositarem a confiança em mim, não conseguiria aplicar os meus conhecimentos sem vocês. Às dentistas Aliane Michelly e Karoline Faria que me receberam muito bem nos estágios obrigatórios e voluntário que tive o prazer de fazer parte e ter colhido um pouco do rico conhecimento que cada uma tem.

À CAPES, CNPQ, IIE, UFCG e CERTBIO pelo suporte financeiro ao longo do curso.

Gratifico o apoio inestimável da instituição UFCG e seus parceiros, apesar de suas adversidades, me ofereceram uma estrutura condizente com o possível para que tudo isso pudesse acontecer.

“Sempre parece impossível até que seja feito.”

Nelson Mandela

RESUMO

A quitosana e a *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis apresentam propriedades físico-químicas e biológicas com potencial para uso terapêutico no tratamento de reparação de feridas cutâneas. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta biológica tecidual em ratos Wistar à implantação de biomembranas à base de quitosana associadas ou não à *Cissus verticillata* (L.). A resposta tecidual foi analisada por meio da histomorfometria no tecido subcutâneo da região dorsal dos ratos. No teste de biocompatibilidade utilizou-se membranas de quitosana sem extrato vegetal (MQ0%), com 5% de extrato vegetal (MQ5%) e com 20% de extrato vegetal (MQ20%) em tempos de 7, 15 e 30 dias. O estudo histopatológico considerou para análise a reação inflamatória (intensidade de células polimorfonucleares, mononucleares e células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho) e o processo de reparo (tecido de granulação e fibroblastos jovens). Os resultados mostraram significativo para o infiltrado inflamatório, tecido de granulação e fibroblastos jovens. Para 7º dia o infiltrado inflamatório foi moderado para todas as membranas, no 15º dias o tecido de granulação foi escasso para todas com diminuição para MQ0% e MQ5% no 30º dia. MQ20% apresentou em 30 dias fibroblastos moderado e escasso para infiltrado inflamatório e tecido de granulação. Assim, todas as membranas foram consideradas biocompatíveis, sem provocar alterações anormais no tecido. Conclui-se que as membranas modularam a fase inflamatória e estimularam a proliferação de fibroblastos, sendo assim, podem ser aplicadas para auxiliar no processo de reparação tecidual.

Palavra-chave: Materiais biocompatíveis. Quitosana. Fitoterapia.

ABSTRACT

Chitosan and *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis present physico-chemical and biological properties with potential for therapeutic use in the treatment of skin wound repair. The objective of this study was to evaluate the tissue biological response in Wistar rats to the implantation of chitosan-based biomembranes associated or not with *Cissus verticillata* (L.). The tissue response was analyzed by histomorphometry in the subcutaneous tissue of the dorsal region of the rats. In the biocompatibility test, chitosan membranes were used without plant extract (MQ0%), with 5% of vegetal extract (MQ5%) and with 20% of vegetal extract (MQ20%) in times of 7, 15 and 30 days. The histopathological study considered for the analysis the inflammatory reaction (intensity of polymorphonuclear cells, mononuclear cells and multinucleated giant cells of the foreign body type) and the repair process (granulation tissue and young fibroblasts). The results showed significant for inflammatory infiltrate, granulation tissue and young fibroblasts. To the 7th day was moderate inflammatory infiltrate in all membranes at 15 ° days the granulation tissue is scarce for all MQ0% with reduction to MQ5% and on the 30th day. MQ20% presented moderate and scarce fibroblasts in 30 days for inflammatory infiltrate and granulation tissue. Thus, all membranes were considered biocompatible without causing abnormal tissue changes. It is concluded that the membranes modulate the inflammatory phase and stimulate the proliferation of fibroblasts, and thus, they can be applied to aid in the tissue repair process.

Keyword: Biocompatible materials. Chitosan. Phytotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Estrutura da quitina.....	17
Figura 02. Organização hierárquica das cutículas mostrando a estrutura ordenada da quitina.....	18
Quadro 1: Relação dos tipos de materiais sintéticos e naturais.....	16
Figura 03. Preparação de quitosana pela desacetilação de quitina.....	19
Figura 04. Visão Macroscópica das membranas. Visão Superior da MQ0% (A). Visão Superior da MQ20% (B). À medida em que a droga vegetal foi incorporada em diferentes concentrações, as membranas tornaram-se esverdeadas, assumindo a coloração da droga vegetal. Adaptada (Rosendo, 2016). Membranas área de 1,00cm ² para implantação nos ratos (C).....	29
Figura 5. Fibroblastos jovens e macrófagos com hemossiderose (A). Infiltrado inflamatório moderado (B), (C) e (D). Presença de fibroblasto jovens e vasos sanguíneos (E). Infiltrado inflamatório moderado e tecido de granulação escasso (F). Escasso infiltrado inflamatório e tecido de granulação neovascularizado (G) e (H). Presença de fibroblastos maduros e vasos sanguíneos (I). Escasso tecido de granulação e moderada proliferação de fibroblastos jovens (J). Menor infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos, tecido de granulação e fibroblastos misto (K) e (L). *Membrana presente na lâmina histológica. Objetiva de 40x.....	33
Gráfico 1: Infiltrado Inflamatório na primeira semana. A MQ0% apresentou diferença significativa com o controle (p=0.039)	32
Gráfico 2: Tecido de granulação em um mês. Observa-se que houve diferença significativa entre o grupo controle e o MQ5% (p=0.017)	34
Gráfico 3: Fibroblastos jovens na segunda semana. Observa-se que a MQ5% apresentou diferença significativa com o controle (p=0.014)	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: CG (Control Group); CM (Chitosan Membrane); 5: ausente; 10: escasso; 15: moderado; 20:intenso. Para as variáveis foi aplicado o teste de qui-quadrado com nível de significância de 5%.....	32
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
Cm	Centímetro
cm ²	Centímetros quadrado
ε	Épsilon
pH	Escala numérica adimensional de acidez ou basicidade de uma solução aquosa
G	Gramma
°C	Grau Celsius
kDa	Kilodalton
\pm	Mais ou menos
®	Marca registrada
μm	Micrômetro
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
Nm	Nanômetro
%	Porcentagem
Kg	Quilograma

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
GAG	Glicosaminoglicano
GC	Grupo controle
MEC	Matriz extracelular
MQ0%	Membranas de quitosana sem extrato vegetal
MQ20%	Membranas de quitosana com 20% do extrato vegetal
MQ5%	Membranas de quitosana com 5% do extrato vegetal
PMN	Polimorfonucleares
SLCF	Sistema de liberação controlada de fármaco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1 BIOMATERIAIS.....	15
2.2 QUITINA.....	17
2.3 QUITOSANA.....	18
2.4 BIOMEMBRANA DE QUITOSANA.....	20
2.5 <i>CISSUS VERTICILLATA</i> (L.) NICOLSON & C.E. JARVIS.....	20
2.6 FERIDAS CUTÂNEAS.....	21
2.7 ENSAIOS DE BIOCOMPATIBILIDADE EM ANIMAIS	22
REFERÊNCIAS.....	24
3 ARTIGO.....	27
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
ANEXO – Normas para publicação.....	45
ANEXOS.....	49
Anexo A.....	49
Anexo B.....	50

1 INTRODUÇÃO

De acordo com *Williams Dictionary of Biomaterials* edição atualizada, um biomaterial pode ser definido como qualquer substância, droga, material natural, sintético ou modificado não vivo usado em um dispositivo médico, destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar, substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (WILLIAMS, 2012). Assim, o biomaterial deve fornecer todo ou parte de um órgão deficiente e para isso necessita-se que seja biocompatível (VÉRONIQUE, 2014; GHASSEMI et al., 2018).

Além da biocompatibilidade, espera-se que um biomaterial desempenhe papéis sofisticados e duradouros nos tecidos, personalizando e otimizando a interface material-tecido, garantindo bons resultados clínicos (HIEW; SIMAT; TEOH, 2018). Em decorrência da união das ciências biológicas, médicas, físicas e químicas nasceu a engenharia de tecidos, ramo da ciência dos biomateriais que apresenta objetivos semelhantes, que é o de fornecer ou substituir todo ou parte de um órgão deficiente (VÉRONIQUE, 2014; HIEW; SIMAT; TEOH, 2018). Com o avanço nas pesquisas, a produção e caracterização de alguns biomateriais se destacaram devido às suas propriedades biológicas e mecânicas (SANTOS et al., 2018).

Dentre os materiais empregados encontram-se os naturais, sintéticos ou combinados, todos com ações biológicas potencialmente satisfatórias (DAWSON et al., 2008). Os materiais polissacarídeos são exemplos de materiais compatíveis com os tecidos biológicos. A quitosana é um polissacarídeo natural que apresenta propriedades físico-químicas e biológicas únicas quando utilizada como Sistema de liberação controlada de fármaco (SLCF) e para aplicações biomédicas diversas (WANG et al., 2015). As pesquisas com o uso de quitosana têm estimulado o desenvolvimento de biomateriais mais eficientes que promovam regeneração do tecido através do crescimento, fixação e proliferação celular (DUTTA, 2016; ROSENDO, 2016).

A quitosana apresenta versatilidade quanto à sua aplicação e funcionalidade (ROSENDO, 2016). Nas terapias com uso dos SLCF, este polímero é um dos excipientes mais utilizados, e pesquisas realizadas já desenvolveram biomateriais em diferentes formas como pomada, hidrogel, microesfera, membrana e cápsula para fins variados na medicina (ASHAMMAKHI, 2007; DUTTA, 2016).

Em virtude das propriedades naturais da quitosana, esse polímero permite o desenvolvimento de sistemas de transporte e melhora o tempo de permanência dos fármacos nos sistemas biológicos (SANTOS et al., 2018). Suas propriedades biológicas incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana, analgésica e hemostática sendo considerado um excelente auxiliar no processo de cicatrização de ferida (XU et al., 2018).

De acordo com Rong; Corrie e Clark (2017), a cicatrização é um processo fisiológico complexo, multifatorial, longo e contínuo. Devido à biodegradação lenta e contínua da quitosana, drogas sintéticas e vegetais são incorporadas a estes biomateriais para atuarem no reparo tecidual, hemostasia, analgesia e dentre outras propriedades referentes a droga (JENNINGS; BUMGARDNER, 2016). Ao longo da história da humanidade, as propriedades fitoquímicas das plantas foram usadas como fontes de medicamentos para diversas doenças (CAETANO et al., 2015).

Segundo Drobnik e Oliveira (2015), uma das plantas utilizadas na cura de abscessos, inflamação e hemorragia é a *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis. Essa pertence à família *Vitaceae* sendo conhecida popularmente como “insulina”. O seu desempenho como cicatrizante em ensaios pré-clínicos em coelhos mostrou-se como potencial alternativa terapêutica no tratamento de reparação de feridas cutâneas (BRAGA, 2008; MILLER et al., 2015).

Além dos benefícios de reparação tecidual da quitosana, pesquisas que a utilizam promovem um desenvolvimento ecologicamente sustentável. Como consequência do descarte irregular dos restos de matéria orgânica (carapaças de crustáceos), principalmente de camarões, se acumulam e promove o desequilíbrio do ecossistema. O reaproveitamento das carapaças evitam a poluição dos mananciais hídricos, acidificação das águas e a morte de plantas e animais (GÓMEZ et al., 2016).

Com base nas evidências mencionadas acima, buscou-se testar as membranas de quitosana sem e com a incorporação da *Cissus verticillata* (L.) em animais, avaliando a sua biocompatibilidade, a fim de que a mesma possa vir a ser empregada como um SLCF, ao efeito da droga vegetal, na cicatrização tecidual.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 BIOMATERIAIS

A definição mais aceita de biomateriais é aquela empregada pela *American National Institute of Health*, que descreve o biomaterial como qualquer substância ou combinação de substâncias, que não drogas, sintéticas ou de origem natural, que podem ser usados por qualquer período de tempo, e que aumenta ou substitui 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).

Com o progresso da tecnologia, esses materiais 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 (WILLIAMS, 1987; JAYAKUMAR; PRABAHARAN; MUZZARELLI, 2011). Com o avanço tecnológico, a engenharia de tecidos tornou-se amplamente importante nas pesquisas de regeneração de tecido, na qual são necessários para o sucesso a promoção do crescimento, fixação e proliferação celular (DUTTA, 2016).

A engenharia de tecidos aplica os princípios da biologia e engenharia para o desenvolvimento de substitutos funcionais para o reparo dos tecidos biológicos (ASHAMMAKHI, 2007). Em geral, as abordagens envolvem a combinação de dois componentes principais - células para regenerar o tecido perdido e danificado e os *scaffolds* (ou arcabouços) que organizam o tecido regenerado num arcabouço tridimensional (DUTTA, 2016).

Com o avanço das pesquisas em regeneração tecidual, a nova geração de biomateriais assemelha-se 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 biomaterial pode ser categorizada de acordo com sua natureza como: natural, sintético ou combinado (HIEW; SIMAT; TEOH, 2018).

Os materiais naturais (Quadro 1) também podem atuar como materiais reparadores para a regeneração de tecidos, como o colágeno e a 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 tecidos. Os materiais polissacarídeos atuam como materiais de suporte, já que são capazes de manter a estrutura da MEC. 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. Esses materiais podem ser à base de polímeros, metais, cerâmicas e grafenos (DAWSON et al., 2008; HERMAWAN; DJUANSJAH; RAMDAN, 2011; DONG; QI, 2015). As vantagens do uso de biomateriais sintéticos sobre os derivados de fontes naturais, incluem a alta reprodutibilidade, degradação controlável, propriedades mecânicas e facilidade de composição controlável dos materiais. 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 adesão celular (ASHAMMAKHI, 2009; HIEW; SIMAT; TEOH, 2018).

Materiais	Base
Naturais	Proteínas: colágeno, fibrina e elastina (RONG; CORRIE; CLARK, 2017).
	Polissacarídeos: como ácido hialurônico, agarose, quitosana e alginato (GHASSEMI et al., 2018).
Sintéticos	Polímeros: ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-láctico (PLLA), copolímero de ácido polilático-co-glicólico (PLGA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e polietileno glicol (PEG) (DAWSON et al., 2008).
	Metais: aço inoxidável de cromo, titânio e tântalo (DONG; QI, 2015).
	Cerâmicos: vidros bioativos, fosfatos de cálcio e hidroxiapatita (DONG; QI, 2015).
	Grafenos: óxido de grafeno, óxido de grafeno reduzido e nanoestruturas com base em grafeno (HERMAWAN; DJUANSJAH; RAMDAN, 2011).

Quadro 1: Relação dos tipos de materiais sintéticos e naturais (Autor, 2018).

Para contornar as deficiências dos biomateriais sintéticos foi realizado a combinação com os naturais. A união desses superam a limitação do uso exclusivo dos polímeros sintéticos suportando a adesão e proliferação celular adequadas nos arcabouços tridimensionais (DONG; QI, 2015).

2.2 QUITINA

A quitina é o segundo polissacarídeo natural mais abundante na natureza e tem origem em carapaças de crustáceos (principalmente conchas de caranguejo e camarão) e parede celular de fungos que consiste em tecido baseado em quitina fibrosa mineralizada (Figura 1). A maior característica deste nanocompósito biológico é a sua organização estritamente hierárquica que revela vários níveis estruturais e moleculares do polissacarídeo de quitina (Figura 2). Observando a nível molecular, a quitina apresenta de 18-25 moléculas sob a forma de cristalino estreito e longas unidades, que são envolvidas por proteínas, formando nanofibrilas de cerca de 2-5 nm de diâmetro e cerca de 300 nm de comprimento. O agrupamento de algumas dessas nanofibrilas formam longas fibras de quitina-proteína de cerca de 50-300 nm de diâmetro (RAABE; SACHS; ROMANO, 2005; CROISIER; JÉRÔME, 2013; HIEW; SIMAT; TEOH, 2018).

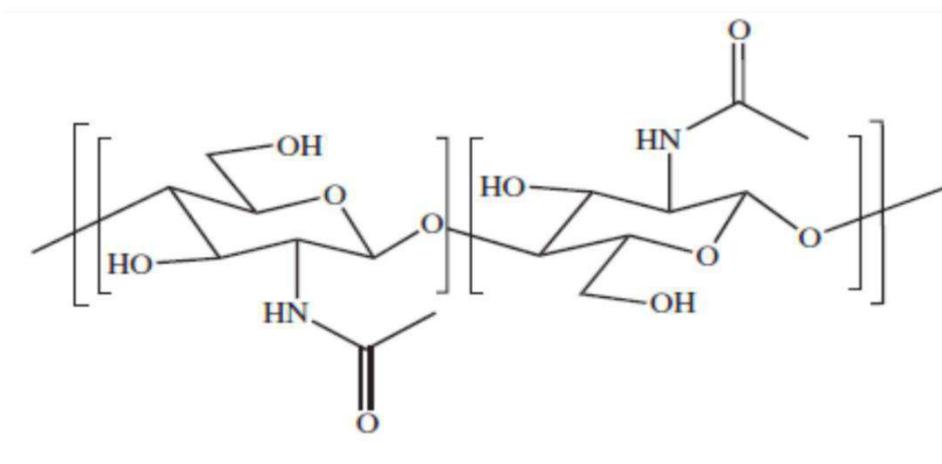


Figura 1: Estrutura da quitina (CROISIER; JÉRÔME, 2013).

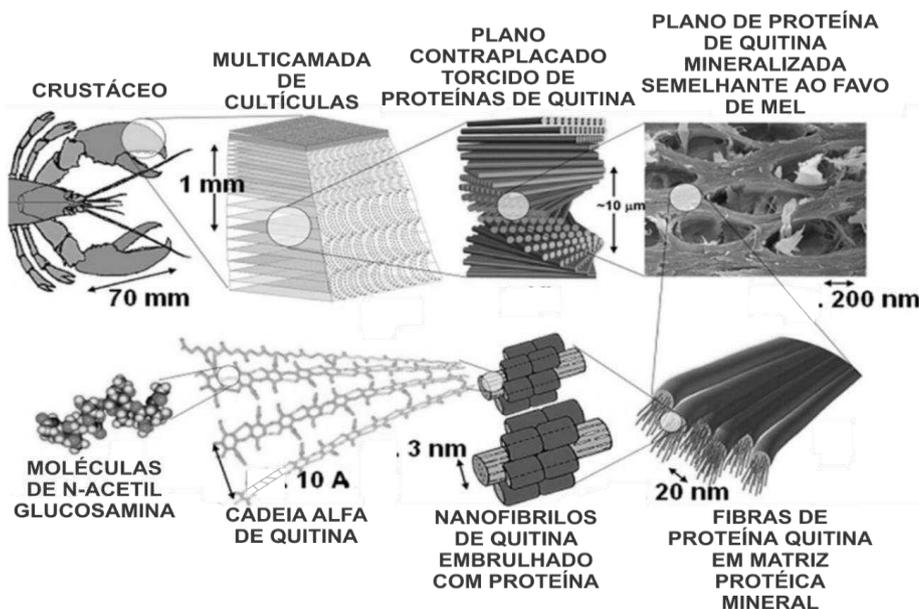


Figura 2: Organização hierárquica das cutículas mostrando a estrutura ordenada da quitina. Adaptada (RAABE; SACHS; ROMANO, 2005).

Apesar de suas propriedades estruturais e biológicas compatíveis, a insolubilidade da quitina na água e em solventes orgânicos comuns é desfavorável para aplicações biomédicas. Assim, várias abordagens têm sido investigadas para aumentar a solubilidade aquosa da quitina, que inclui desacetilação, carboximetilação e sulfatação (DEEPA et al., 2018). Tais técnicas condensam a molécula de quitina em quitosana.

2.3 QUITOSANA

A quitosana é um polissacarídeo natural, linear, derivado da quitina onde pode ser total ou parcialmente desacetilada (WASUPALLI; VERMA, 2018). Uma característica da quitosana 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).

A quitosana é composto de β (1-4) glucosamina ligada e N-acetil glucosamina, cuja relação determina seu grau de desacetilação (Figura 3). O peso molecular da quitosana varia de 30 a 1000 kDa e grau de desacetilação de 50 a 95%, o qual depende principalmente de sua fonte e o método de preparação (WASUPALLI; VERMA, 2018).

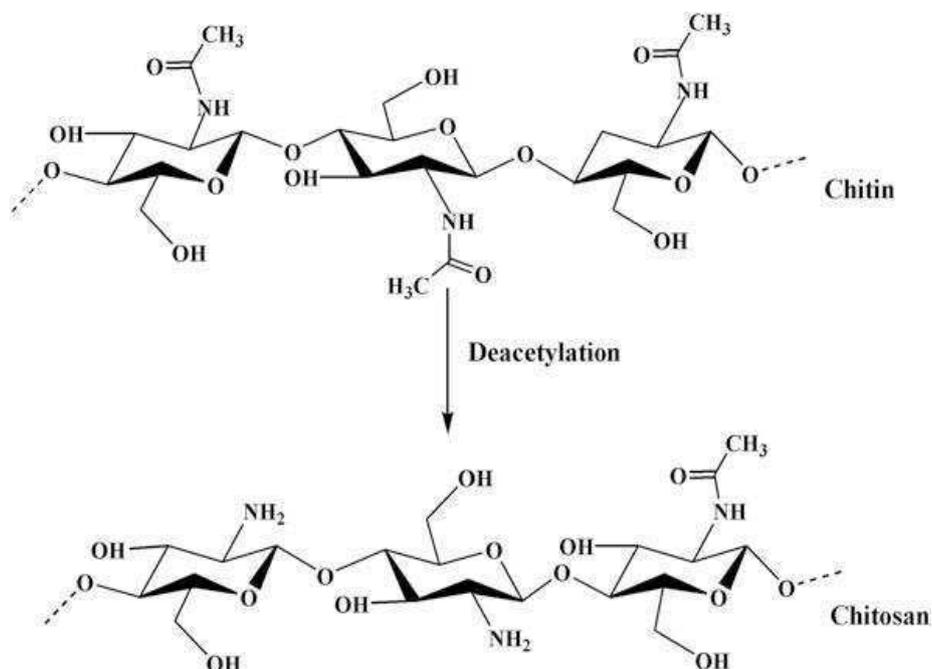


Figura 3: Preparação de quitosana pela desacetilação de quitina (DUTTA, 2016).

Ela pode ser prontamente preparada usando uma variedade de substâncias polianiónicas biocompatíveis, como sulfato, citrato e tripolifosfato. A quitosana é solúvel em meio ácido devido à protonação do seu grupo amino livre no componente glicosamina. Sendo catiônico na natureza, a quitosana se liga eletrostaticamente ao Glicosaminoglicano (GAG), moléculas que estão predominantemente ligadas a muitas citocinas e fatores de crescimento presentes em nosso corpo (DUTTA, 2016; GEORGOPOULOU et al., 2018; WASUPALLI; VERMA, 2018).

Essa molécula polimérica apresenta várias propriedades biológicas como biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana, não toxicidade, não imunogenicidade, analgesia e hemostasia, atuando no reparo tecidual (ROSENDO, 2016). Além disso, a quitosana aliada a materiais naturais poliméricos e biocerâmicas pode ser aplicada para a regeneração do tecido ósseo (MEDEIROS et al., 2016). Portanto, a quitosana é um material ideal para curativos de feridas, SLCF e *scaffolds* na engenharia de tecidos, agindo no processo de regeneração (CROISIER; JÉRÔME, 2013; WASUPALLI; VERMA, 2018).

A quitosana é um dos materiais mais usados como biomaterial em pele e sua aplicação é aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Esta promove a infiltração de células polimorfonucleares e estimula fortemente a proliferação de fibroblastos da pele humana, portanto, auxilia o processo de cicatrização de feridas (GEORGOPOULOU et al., 2018). Devido à sua estrutura, ela é usada para liberação de biofármacos e também de moléculas

bioativas, como por exemplo FGF (Fator básico de crescimento de fibroblastos) e o EGF (Fator de crescimento epidérmico humano) (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 β 1, que desempenham papel importante na cicatrização (DUTTA, 2016).

Essas características da quitosana estimulam pesquisas no desenvolvimento de sistemas de liberação para uma ampla gama de agentes biológicos (DEEPA et al., 2018). Suas propriedades mucoadesivas naturais permitem o desenvolvimento de sistemas de transporte de fármacos bioadesivos que podem se ligar à mucosa intestinal e, assim, melhorar 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 biomembranas.

2.4 BIOMEMBRANAS DE QUITOSANA

Em consequência do crescente número de estudos com a quitosana, observou-se várias aplicações do biomaterial, incluindo para o tratamento de água, como membranas, hidrogéis, adesivos, antioxidantes, biosensores, embalagens de alimentos e entrega de medicamentos (JAYAKUMAR; PRABAHARAN; MUZZARELLI, 2011; DEEPA et al., 2018; WASUPALLI; VERMA, 2018).

A depender do objetivo proposto para a membrana de quitosana, o seu processo de preparo pode apresentar variadas fases. Para promoção da cicatrização tecidual, as características mais desejáveis para a membrana de quitosana incluem: adequada resistência mecânica, permeabilidade aquosa, forma plana e degradação suave e lenta *in vivo* (WASUPALLI; VERMA, 2018). Os objetivos biológicos a serem almejados são aumento de fibroblastos, produção de colágeno e promoção do crescimento de células epiteliais, além da inibição da contaminação bacteriana (JENNINGS; BUMGARDNER, 2016). Outras substâncias que despertam interesse na ciência e que promovam ações biológicas semelhantes são as plantas medicinais.

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

A planta *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis é uma trepadeira tropical descrita desde 1749 por Linnae (BRAGA, 2008; DROBNIK; OLIVEIRA, 2015). O gênero

Cissus é o maior da família *Vitaceae*, sendo constituído de cerca de 350 a 400 espécies de trepadeiras, com uma distribuição pantropical (BRAGA, 2008). Ao longo dos anos, ela recebeu vários nomes, incluindo: *C. cordifolia* L., *Viscum verticillatum* L. e *Vitis sicyoides* (L.). Na literatura, a planta é conhecida também como *Cissus sicyoides* e popularmente é chamada de “insulina” (DROBNIK; OLIVEIRA, 2015).

A *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis é muito estudada anatomicamente e quimicamente. Dos compôs Q1tos fitoquímicos mais encontrados na planta, principalmente nas folhas, estão os fenólicos (especialmente taninos), esteróides, triterpenos, aminoácidos, compostos graxos, flavonóides (mais especificamente, kaempferol, luteolina e luteolina-3'-sulfato), óleos essenciais e polissacarídeos (mucilagem). O composto fenólico e os óleos essenciais determinam o uso medicamentoso contra várias doenças, por exemplo, inflamação generalizada e hemorragia, além de ter ação antiepiléptica, anti-hipertensiva, antipirética e antirreumática e ação hipoglicemiante (OLIVEIRA et al., 2012; DROBNIK; OLIVEIRA, 2015; ROSENDO, 2016).

2.6 FERIDAS CUTÂNEAS

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

A cicatrização constitui um conjunto dinâmico de alterações teciduais na manutenção da integridade do organismo, onde envolve inflamação, quimiotaxia, proliferação, diferenciação e remodelação celular (GARROS et al., 2006; YOU; HAN, 2014).

A pele quando íntegra é composta de três camadas: a camada mais externa é a epiderme, a camada média é a derme e abaixo da derme está a camada de gordura subcutânea (MESCHER, 2016). Sabe-se que o processo de cicatrização de feridas na pele ocorre após o reparo de uma lesão. 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).

Segundo You e Han (2014), em condições normais, as feridas cicatrizam de acordo com um processo sequencial específico: 1) hemostasia, 2) inflamação, 3) proliferação e 4) remodelação. Tal processo inclui: coagulação, inflamação, formação tecidual, angiogênese, formação de fibroblastos e colágeno, reepitelização e remodelagem tecidual (CAETANO, 2015; MESCHER, 2016).

Após a lesão na pele, um conjunto de eventos bioquímicos complexos ocorre em uma cascata orquestrada para reparar o dano. 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). Existe diferentes formas de avaliar a reparação tecidual da pele dentre estas pode-se destacar os ensaios *in vivo* com uso de animais.

2.7 ENSAIOS DE BIOCAMPATIBILIDADE EM ANIMAIS

Os ensaios com animais desempenham um papel vital na pesquisa visando melhorar a saúde humana. Nesse tipo de pesquisa, é imprescindível considerar a ética e todas as regras que envolvem experimentos em animais. Esses estudos oferecem uma ampla gama de possibilidades para examinar a toxicidade das drogas, do biomaterial, estudar a patologia, e explorar os possíveis potenciais terapêuticos do fármaco, evitando tais ensaios em seres humanos (HOOIJMANS et al., 2014; PARETSIS et al., 2017).

Para simular condições semelhantes aos seres humanos, 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 mais utilizados, pois atendem as características, como: facilidade de manuseio, fácil domesticação, adaptação a ambientes variados e sociabilidade (UNDERWOOD et al., 2013).

Para experimentos em roedores há diversificados protocolos de manuseio, anestesia, técnicas cirúrgicas, pós-operatório, medicação, alimentação e eutanásia. Esses protocolos detalham regiões anatômicas, instrumentos laboratoriais e cirúrgicos, concentrações de fármacos e períodos específicos para os variados testes experimentais em ratos (NEVES 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 o consagrado para pesquisas (ANDERSEN et al., 2004; HOOIJMANS et al., 2014; PARETSIS et al., 2017).

Os ratos Wistar são caracterizados pelas orelhas alongadas, cabeça grande e comprimento da cauda sempre menor que o comprimento corporal. A gestação dura em média 21 dias e o desmame ocorre entre 17 e 19 dias de idade. São considerados animais dóceis, de fácil manipulação e têm boa capacidade de aprendizado (RESOLUÇÃO NORMATIVA, 2013).

REFERÊNCIAS

- 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.
- ASHAMMAKHI, N. **Topics in Tissue Engineering**, v. 5, n. 1, p.1-33, 2009.
- 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 *Cissus verticillata* nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* como antioxidante, antifúngico, hipoglicemiante e cicatrizante. **Dissertação** (Dissertação em Ciências Farmacêuticas) – UFOP. Ouro Preto, p. 2-14, 2008.
- 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 Part B: Applied Biomaterials**, v. 103, n. 5, p. 1013-1022, 2015.
- CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780-792, 2013.
- 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.
- DBCA. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos** - Disponível em: < http://www.sbcal.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65>. Acesso em: 23 de julho de 2018, 07:21:52.
- 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.
- 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.; OLIVEIRA, A. B. DE. *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.

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, 26 Mar., 2018.

GHASSEMI, T.; 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.

GÓMEZ, D.; NAGEL-HASSEMER, M. E.; LAPOLLI, F. R.; LOBO-RECIO, M. A. Potencial dos resíduos do processamento de camarão para remediação de águas contaminadas com drenagem ácida mineral. **Polímeros**, v. 26, p. 1-7, 2016.

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

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.

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 Volume 2: Tissue Engineering and Therapeutics**. Elsevier Science, 2016.

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.

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. **Rev. Bras. Odontol.**, 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. **Wound repair 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.

NEVES, S. M. P.; FILHO, J. M.; MENEZES, E. W. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo FCF-IQ/USP., 2013.

OJEH, N.; PASTAR, I.; TOMIC-CANICO, M.; STOJADINOVIC, O. Stem Cells in Skin Regeneration, Wound Healing, and Their Clinical Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 254-255, Oct., 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 histomorfológica da regeneração óssea a partir da utilização de biomateriais em tíbias de ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 1537-1544, 2017.

RAABE, D.; SACHS, C.; ROMANO, P. The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material. **Acta Materialia**, v. 53, n. 15, p. 4281-4292, 2005.

RESOLUÇÃO NORMATIVA N 15, DE 16 DE DEZEMBRO DE 2013. **Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica**. Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/comissoesib/ceua/normas-decretos/bioterios.html>>. Acesso em: 23 de julho de 2018, 07:14:30.

RONG, G.; CORRIE, S. R.; CLARK, H. A. *In Vivo* Biosensing: Progress and Perspectives. **ACS Sensors**, 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, p. 33-54. 2016.

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.

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

VÉRONIQUE, M. Definitions. In: **Biomaterials**. Wiley-Blackwell, p.11-25, 2014.

WANG, Y.; GUO, X.; PAN, R.; HAN, D.; CHEN, T.; GENG, Z.; XIONG, Y.; CHEN, Y. Electrodeposition of chitosan/gelatin/nanosilver: A new method for constructing biopolymer/nanoparticle composite films with conductivity and antibacterial activity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 53, p. 222-228, 2015.

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.

WILLIAMS, D. F. **The Williams Dictionary of Biomaterials**. Liverpool University Press, 2012.

WILLIAMS, D. F.; BIOMATERIALS, E. S. F. **Definitions in Biomaterials: Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986**. Elsevier, 1987.

YOU, H. J.; HAN, S. K. Cell Therapy for Wound Healing. **Journal of Korean Medical Science**, v. 29, n. 3, p. 311-319, Mar., 2014.

XU, W.; WANG, Z.; LI, Y.; WANG, L.; JIANG, Z.; LI, T.; LIANG, Y. Mixed membranes of carboxymethylchitosan / gelatin / hyaluronic acid as support for epithelial transplantation for wound healing in the cornea. **Carbohydrate Polymers**, n. 192, p. 240-250, 2018.

3 ARTIGO

Avaliação *in vivo* da Biocompatibilidade de Membranas de Quitosana / *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & c.e. Jarvis

Rafael Rodrigues de Siqueira¹, Denis Candeia Pereira Oliveira¹, Marcus Vinícius Lia Fook², Arthur Willian de Lima Brasil³, Millena de Oliveira Firmino⁴, Luanna Abílio Diniz Melquiades de Medeiros⁵, Elizandra Silva da Penha⁵, Rosana Araújo Rosendo⁵

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

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

³Professor Doutor, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Rondônia, Brasil.

⁴Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Paraíba, Brasil.

⁵ Professora Adjunta da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Paraíba, Brasil.

RESUMO

As pesquisas sobre os biomateriais são um dos promissores campos de estudo na área biomédica, com destaque para quitosana. O objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade em ratos Wistar à implantação de membranas à base de quitosana associada ou não ao extrato vegetal da planta *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis. Utilizou-se membranas de quitosana sem extrato vegetal (MQ0%), com 5% de extrato vegetal (MQ5%) e com 20% de extrato vegetal (MQ20%) em tempos de 7, 15 e 30 dias. Os resultados mostraram moderado infiltrado inflamatório no dia 7 para todas membranas, no dia 15 escasso tecido de granulação, no dia 30 os fibroblastos foram escassos e tecido de granulação moderado para MQ0% e MQ5% com fibroblastos moderado e tecido de granulação escasso para MQ20%. Conclui-se que todas as membranas são biocompatíveis e modularam a fase inflamatória e estimularam a proliferação de fibroblastos.

Keywords: Materiais biocompatíveis. Quitosana. Fitoterapia.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com *Williams Dictionary of Biomaterials*, qualquer substância, droga, material natural, sintético ou modificado não vivo usado em um dispositivo médico, destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar, substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo é definido como biomaterial¹. Assim, o biomaterial deve fornecer todo ou parte de um órgão deficiente e para isso necessita-se que o mesmo seja biocompatível^{2,3}.

Dentre os biomateriais empregados encontram-se os naturais, sintéticos ou combinados, todos com ações biológicas potencialmente satisfatórias⁴. Os materiais polissacarídeos são exemplos de materiais biocompatíveis com os tecidos biológicos. A quitosana é um polissacarídeo natural que apresenta propriedades físico-químicas e biológicas únicas quando utilizada como sistema de liberação controlada de fármaco (SLCF) e para outras aplicações biomédicas⁵. As pesquisas com o uso de quitosana têm estimulado o desenvolvimento de biomateriais mais eficientes que promovam regeneração do tecido através do crescimento, fixação e proliferação celular^{5,6}. A quitosana apresenta versatilidade quanto à sua aplicação e funcionalidade⁷. Nas terapias com uso dos SLCF, esse polímero é um dos excipientes mais utilizados, e pesquisas realizadas já desenvolveram biomateriais em diferentes formas como pomada, hidrogel, microesfera, membrana e cápsula para fins variados na medicina^{6,7,8}.

Suas propriedades biológicas incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana, analgésico e hemostático sendo considerado um excelente auxiliador no processo de cicatrização de feridas^{9,10}. Devido à biodegradação lenta e contínua da quitosana, drogas sintéticas e vegetais são incorporadas aos biomateriais de quitosana para atuarem no reparo tecidual¹¹. Ao longo da história da humanidade, a fitoterapia foi e é usada como fonte de medicamento para diversas doenças, incluindo a reparação tecidual¹².

Segundo Drobnik e Oliveira¹³, uma das plantas utilizadas na cura de abscessos, inflamações e hemorragias é a planta *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis, pertencente à família *Vitaceae*. O seu desempenho na cicatrização em ensaio pré-clínico em coelhos mostrou-se como potencial alternativa terapêutica no tratamento de reparação de feridas cutâneas^{14,15}.

Com base nas evidências mencionadas, buscou-se testar membranas de quitosana sem e com a incorporação da *Cissus verticillata* (L.) em animais, avaliando a sua biocompatibilidade, a fim de que a mesma possa vir a ser empregada como um SLCF, na cicatrização tecidual.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, do Centro de Saúde e Tecnologia Rural - CSTR/UFCG, Patos - Paraíba, sob o número de número n° 068-2017 (Anexo A). Foram utilizados 60 ratos machos da linhagem Wistar, machos, adultos, peso médio 250g provenientes do curso de nutrição da UFCG, Cuité. Os animais foram distribuídos em grupos: 15 ratos do grupo controle (GC), 15 ratos do grupo com membranas de quitosana sem extrato vegetal (MQ0%), 15 ratos do grupo com 5% de extrato vegetal (MQ5%) e 15 ratos do grupo com 20% de extrato vegetal (MQ20%) em tempos de 7, 15 e 30 dias. Foram acomodados no gabinete para biotério INSIGHT® em local climatizado, temperatura de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade de 41% no LBio (Laboratório de Bioensaios em Materiais) da UFCG. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* e ciclos alternados de luminosidade a cada 12 horas.

As membranas de Quitosana/*Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis foram produzidas seguindo a metodologia utilizada por Rosendo (2016) (Figura 5). Este foi produzido e caracterizada no CERTBIO (Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais) na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) e registrado no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado), sendo a quitosana registrada sob protocolo AEBD12D e a planta sob protocolo A18AA04.

Todas as biomembranas foram produzidas utilizando quitosana de médio peso molecular com grau de desacetilação alcalina de 90%, associadas ao extrato alcóolico da planta *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis.

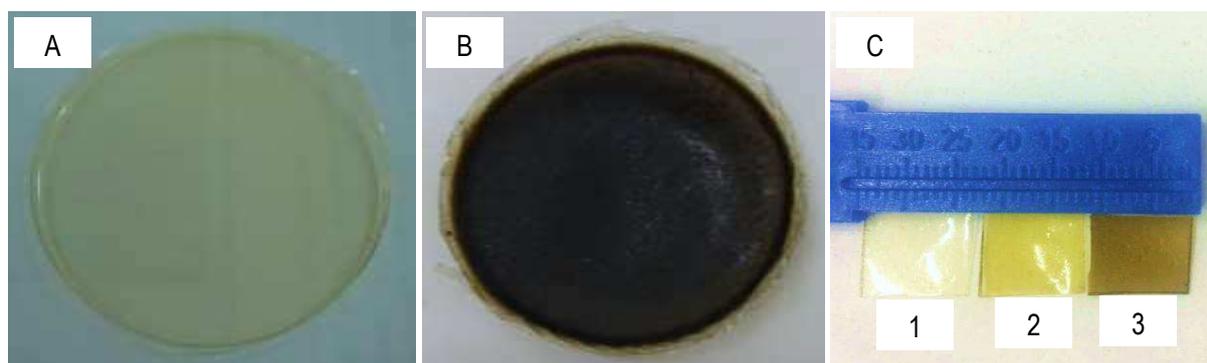


Figura 4: Visão Macroscópica das membranas. Visão Superior da MQ0% (A). Visão Superior da MQ20% (B). À medida em que a droga vegetal foi incorporada em diferentes concentrações, as membranas tornaram-se esverdeadas, assumindo a coloração da droga vegetal. Adaptada

(Rosendo, 2016). Membranas área de 1,00cm² para implantação nos ratos, C1:MQ0%, C2: MQ5% e C3: MQ20% (C). Autor 2018.

Os ratos foram da anestesiados por injeção intraperitoneal da mistura de cloridrato de cetamina (Ketamin[®]) (100mg / kg), cloridrato de xilazina (Calmiun[®]) (10mg / kg) e cloreto de sódio a 0,9%. Em seguida foi realizada a assepsia com clorexidina 0,2% e tricotomia da região do dorso direito do rato, sob o músculo dorsal direito. Os animais receberam anestesia local por infiltração anestésica subcutânea com cloridrato de lidocaína a 2% e noradrenalina a 1:50.000 (Lidostesim 2%, Probem[®]), 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 na região do dorso direito e realizada divulsão dos tecidos. Cada loja cirúrgica foi preenchida com o biomaterial com área de 1,00cm². Realizou-se a síntese da ferida dorsal com pontos simples mono nylon 5-0. Após tal processo, os ratos foram medicados com analgésico Dipirona Sódica 500mg/mL, duas gotas. Foram realizados os mesmos procedimentos para os grupos MQ0%, MQ5% e MQ20% com exceção do GC na qual não foi realizada a implantação de nenhuma membrana.

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 (Calmiun[®]) (10mg / kg), via intraperitoneal, seguindo o protocolo de eutanásia da Universidade do Oeste de Santa Catarina (Anexo B). Depois foi realizada a técnica de deslocamento cervical de acordo com o *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition*¹⁶. A comprovação da eutanásia ocorreu pela ausência de reflexo palpebral, de movimentos torácicos e de 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 (uma área de aproximadamente de 2cm²). As biópsias destinadas à histologia foram fixadas em solução tamponada de formol a 10% (pH 7.4), por 7 dias. Após esse período, encaminhou-se os espécimes para clivagem e confecção das lâminas histológicas utilizando a coloração Hematoxilina & Eosina.

As lâminas foram confeccionadas no laboratório de Patologia do Departamento de Patologia do curso de Veterinária da UFCG, campus Patos-PB. Elas foram fotodocumentadas ao microscópio Axio Scope.A1 acoplada à câmera digital Axio Cam MRc5, controlada pelo programa Zen. 3. 2012. 4. para análise da reação inflamatória e processo de reparo, foco de necrose, edema, células gigantes multinucleadas e hemorragia. Avaliou-se os escores onde classificou-se em ausente (5), escasso (10), moderado (15) e intenso (20).

Considerando-se a mediana dos grupos, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis para avaliar os escores dos seguintes eventos: grau de inflamação, edema, necrose, fibroblastos jovens, células gigantes, tecido de granulação, colágeno e hemorragia. O teste de qui-quadrado foi empregado para avaliar todas as variáveis, comparando as proporções entre os GC, MQ0%, MQ5% e MQ20% para os tempos de 7, 15 e 30 dias. Ambos os testes com nível de significância de 5%. O software SPSS 23 foi aplicado para realização dos gráficos e dos testes estatísticos.

3. RESULTADOS

3.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA – EXAME CLÍNICO

Após 7, 15 e 30 dias observou-se uma evolução satisfatória da ferida cirúrgica, sem sinais de infecção bacteriana, edema e secreção purulenta em todos os grupos. Com 30 dias a cicatrização foi observada e as membranas não se apresentaram volumosas, nem provocaram qualquer outra alteração visível no local em que foram implantadas, semelhante ao observado no GC.

3.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Para análise considerou-se a reação inflamatória (intensidade de células polimorfonucleares, mononucleares e células gigantes multinucleadas das do tipo corpo estranho) e processo de reparo (tecido de granulação e fibroblastos jovens). Outros fenômenos foram analisados, no entanto, não apresentaram resultados significativos: edema, necrose, colágeno e hemorragia.

A reação inflamatória e o processo de reparação nas feridas cirúrgicas de todos os três grupos experimentais, empregou-se a coloração com hematoxilina e eosina (Tabela 1).

	Tempo							
	7 dias		15 dias		30 dias			
	Grupo	valor-p	Grupo	valor-p	Grupo	valor-p		
Infiltrado Inflamatório	GC (10)	MQ0% (15)	0.034	GC (10)	0.055	GC (5)	MQ 0% (10)	0.060
		MQ 5% (15)					MQ 5% (10)	
		MQ20% (15)					MQ20% (10)	
Tecido de Granulação	GC (5)	MQ 0% (5)	0.773	GC (5)	0.033	GC (5)	MQ 0% (15)	0.020
		MQ 5% (5)					MQ 5% (10)	
		MQ 20% (5)					MQ20% (10)	

Fibroblasto Jovem	GC (5)	MQ 0% (15)	0.080	GC (5)	MQ 0% (5)	0.020	CG (5)	MQ 0% (10)	0.002
		MQ 5% (10)			MQ 5% (15)			MQ 5% (10)	
		MQ20% (15)			MQ20% (10)			MQ20% (15)	

Tabela 1: utilizado o teste de Kruskal Wallis para avaliar os escores onde classificou-se em ausente (5); escasso (10); moderado (15); intenso (20). Para as variáveis foi aplicado o teste de qui-quadrado com nível de significância de 5%.

3.2.1 Infiltrado Inflamatório

No sétimo dia, as análises de todas as amostras revelaram significativamente um aumento da celularidade nos grupos MQ0%, MQ5% e MQ20% em comparação com o grupo controle (Gráfico 1).

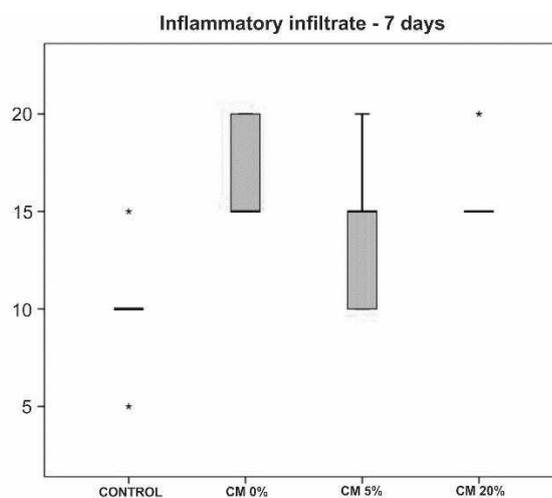


Gráfico 1: Infiltrado Inflamatório na primeira semana. A MQ0% apresentou diferença significativa com o controle ($p=0.039$).

Para o tempo de 15 dias, os grupos MQ0% e MQ5% apresentaram redução do infiltrado inflamatório com presença de células mononucleares de tecido conjuntivo fibroso, macrófagos e linfócitos, com exceção da MQ20% ($p=0.055$) que apresentou infiltrado inflamatório misto.

No 30º dia, para os grupos MQ0% e MQ5% observaram-se uma diminuição do infiltrado inflamatório ($p=0.060$), com escassez de macrófagos, mesmo assim, a MQ20% apresentou-se com moderado infiltrado inflamatório de células mononucleares.

O grupo controle apresentou infiltrado inflamatório ausente com tecido conjuntivo maduro e organizado (Figura 6).

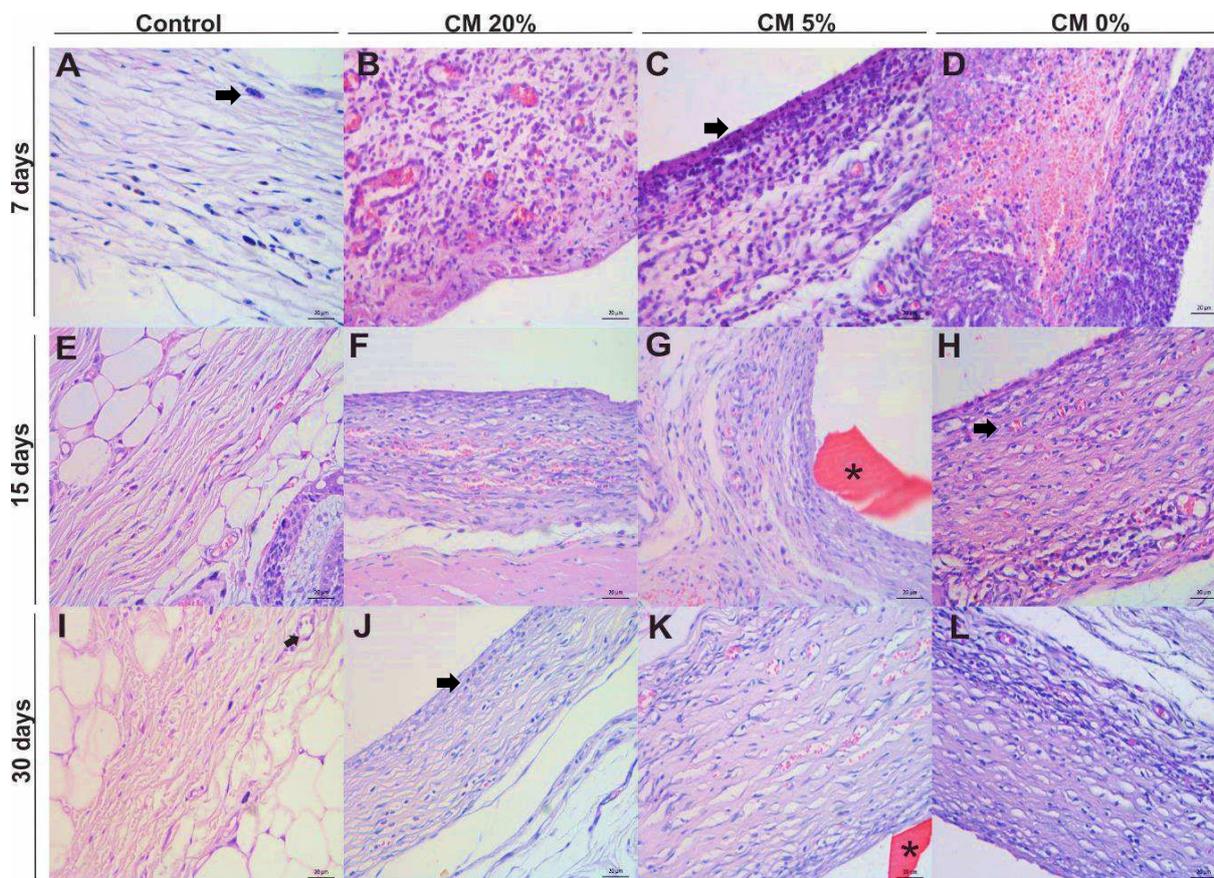


Figura 5: Fibroblastos jovens e macrófagos com hemossiderose (A). Infiltrado inflamatório moderado (B), (C) e (D). Presença de fibroblasto jovens e vasos sanguíneos (E). Infiltrado inflamatório moderado e tecido de granulação escasso (F). Escasso infiltrado inflamatório e tecido de granulação neovascularizado (G) e (H). Presença de fibroblastos maduros e vasos sanguíneos (I). Escasso tecido de granulação e moderada proliferação de fibroblastos jovens (J). Menor infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos, tecido de granulação e fibroblastos misto (K) e (L). *Membrana presente na lâmina histológica. Objetiva de 40x.

3.2.2 Tecido de Granulação

Observou-se um pronunciado tecido de granulação neovascularizado a partir do 15º dia em todos os grupos, principalmente próximo à ferida. Assim, foi constatado ausente para todas as membranas no 7º dia ($p=0.773$) e moderado no 15º dia ($p=0.033$). O tecido de granulação foi moderado para MQ0% e MQ5% e escasso par MQ20% no período de 30 dias ($p=.0.020$), com exceção do grupo controle que foi ausente (Gráfico 2).

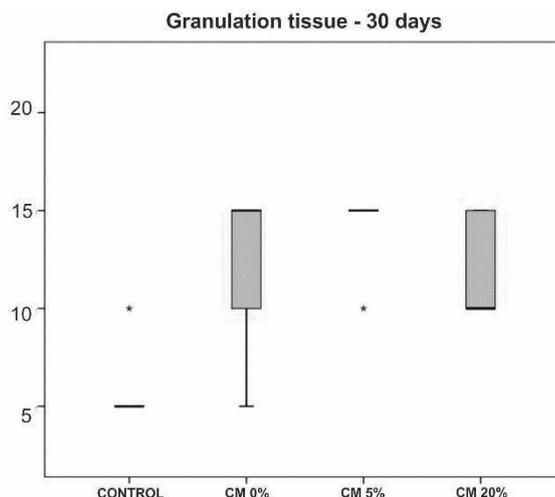


Gráfico 2: Tecido de granulação em um mês. Observa-se que houve diferença significativa entre o grupo controle e o MQ5% ($p=0.017$).

3.2.3 Fibroblastos

Foi constatada escassez de fibroblastos jovens no 7º dia para MQ5% ($p=0.080$) e moderado para MQ0% e MQ20%. A fibroplasia no 15º dia para todos os grupos mostrou-se mais estimulada com alto grau de diferenciação ($p=0.020$) (Gráfico 3).

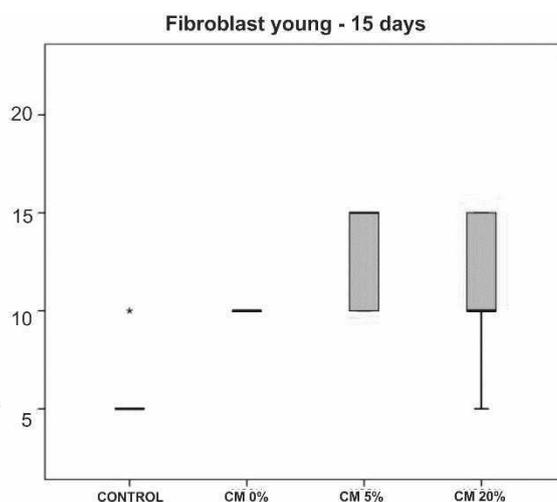


Gráfico 3: Fibroblastos jovens na segunda semana. Observa-se que a MQ5% apresentou diferença significativa com o controle ($p=0.014$).

No 30º dia, os fibroblastos jovens foram escassos para MQ0% e MQ5% em comparação com o grupo controle. Para a MQ20%, o estímulo aumentou, apresentando fibroblastos bem organizados no tecido recém-formado, dispostos paralelamente, diferente do grupo controle.

4. DISCUSSÃO

Apesar dos vários relatos na literatura acerca das importantes propriedades biológicas da quitosana e da planta *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis utilizados de forma isolada, não há citação sobre a ação conjunta do complexo polieletrólítico de Quitosana/*Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis a biocompatibilidade em modelos *in vivo*^{7,14}.

O processo de reparação tecidual é dividido em fases com limites não distintos, mas com cronologia definida: hemostasia; fase inflamatória; formação do tecido de granulação com deposição de matriz extracelular (colágeno, elastina e fibras reticulares) e remodelação^{17, 18}. O fechamento da ferida envolve uma interação orquestrada e complexa de diferentes tipos de células, principalmente neutrófilos, leucócitos, macrófagos, fibroblastos e queratinócitos^{19, 20}.

Os resultados observados neste estudo demonstram que, a reação inflamatória em relação ao grupo controle foi moderado, nos grupos MQ0%, MQ5% e MQ20% (dia 7), corroborando com os estudos de Caetano et al.¹² e Wang et al.²¹, que testaram uma membrana de quitosana/alginato em ratos Wistar para avaliação da cicatrização de feridas cutâneas, no tempo de 7 dias. Comparando as membranas entre si, a MQ0% apresentou uma diferença significativa em relação ao controle, presumindo que a quitosana estimulou o processo inflamatório e o complexo quitosana / extrato vegetal controlaram os mediadores da inflamação. Quanto à MQ5% e MQ20%, ambas estimularam um menor infiltrado inflamatório em relação à MQ0%, no entanto, a MQ5% foi a única que apresentou amostras semelhante ao controle para o mesmo evento.

Como a quitosana é capaz de acelerar o processo de cicatrização de feridas através da ativação de macrófagos, aumento do número de fibroblastos e pela diferenciação celular, em conjunto com a reação inflamatória inata, tal complexo por fim promove uma exarcebação da resposta celular^{17, 22, 23, 24}. Outro motivo para o aumento de macrófagos e células em diferenciação no tecido adjacente à membrana pode ser devido à interação da porção catiônica da quitosana e a porção hidrofóbica do extrato vegetal com a membrana celular dos fibroblastos e a matriz extracelular do tecido conjuntivo de carga aniônica^{25, 26}.

Em sua despolarização a quitosana libera, a partir da hidrólise, oligômeros de N-acetil- β -D-glicosamina, que entram na via metabólica sendo incorporados às glicoproteínas, sendo estas responsáveis pela rápida proliferação de fibroblastos e deposição ordenada de colágeno^{2,3 24, 27}. Os oligômeros estimulam e modulam a síntese do ácido hialurônico natural que desempenha papel na morfogênese e inflamação, promovendo maior motilidade celular, adesão e proliferação^{28, 21}.

Os neutrófilos são responsáveis por iniciar e modificar o processo inflamatório agudo, por fagocitar e eliminar microrganismos²⁹. Os resultados do presente estudo mostraram um moderado infiltrado inflamatório, com predomínio de neutrófilos, no início do processo de reparação tecidual (dia 7). De acordo com Caetano et al.¹², o aumento do infiltrado inflamatório observado em seu estudo foi possivelmente devido aos linfócitos CD41, e à redução extrema de células CD81 e células CD11b1, sugerindo que sua presença é importante como regulador do complexo processo de cicatrização de feridas³⁰.

Na avaliação entre o 7º e o 15º dias de pós-operatório, observou-se uma redução significativa de infiltrado inflamatório seguido pela diminuição de neutrófilos nos grupos MQ0% e MQ5%, podendo indicar que a membrana de Quitosana/*C. verticillata* (L.) melhora a regulação e o estímulo inflamatório em comparação ao grupo controle. Assim, sugere-se que essa diminuição ocorreu devido ao recrutamento de macrófagos, célula fundamental no desempenho do processo de cicatrização, pois continua a ação dos neutrófilos, atuando como célula reguladora, como fator de crescimento e liberador de vários tipos de metaloproteinases^{30, 31}.

No estudo de Xu et al.⁹, onde empregou-se uma membrana de carboximetilquitosana em coelhos para avaliar a biocompatibilidade do material, observou-se uma diminuição significativa na reação inflamatória às membranas após o 15º dia, resultados semelhantes aos deste trabalho. Braga¹⁴ verificou que o extrato vegetal de *C. verticillata* (L.) apresentou grandes concentrações de compostos fenólicos, flavonóides e rutina, responsáveis por uma maior atividade antioxidante, anti-inflamatória e angiogênese^{13, 7}. Assim, tanto a quitosana quanto os metabólitos secundários atuam na diminuição do processo inflamatório.

A formação de vasos sanguíneos é uma fase importante para cicatrização adequada, proporcionando maior oxigenação do tecido, chegada de nutrientes e desenvolvimento e crescimento celular³². Os resultados apresentados neste trabalho, não identificaram a presença significativa de vasos sanguíneos nos primeiros dias da reparação da ferida cirúrgica em comparação com os tempos de 15 e 30 dias. Segundo Kim et al.³³, em seus estudos empregando modelos *in vitro*, observou-se uma inibição da angiogênese relacionada à presença de compostos flavonóides, também conhecidos como inibidores de angiogênese derivados de fontes naturais³⁴. Além disso, outros compostos químicos, com ação antiangiogênica, foram descritos em extratos de *C. verticillata* (L.), como por exemplo, o β -sitosterol, o resveratrol e a quercetina^{35, 36}.

Entretanto, uma pesquisa realizada por Ren et al.³⁷ demonstrou que a atividade dos flavonóides promove uma migração celular desorganizada, semelhante ao tecido de granulação,

tardamente no processo de cicatrização. Tais dados corroboram com os observados nas condições estabelecidas neste trabalho, em que se presenciou um aumento do tecido de granulação no 15º dia para os grupos MQ5% e MQ20%. No 30º dia, MQ5% induziu um maior tecido de granulação por mais tempo, diferente do MQ20% que induziu uma quantidade menor.

Após a fase de neovascularização, o tecido de granulação constituído principalmente por fibroblastos e seus produtos é formado^{29,38,39}. Os resultados apresentados na pesquisa no 7º dia mostraram que os fibroblastos jovens no grupo MQ5% foi escasso e moderado para MQ0% e MQ20%. Os resultados da primeira semana para MQ0% podem ser em consequência da alta concentração da quitosana que ativa plaquetas na fase inflamatória, as quais aumentam a formação de tecido de granulação, incluindo fibroblastos, e a angiogênese pela proliferação de células mesenquimais e endoteliais^{14, 25, 26, 37, 40}. Ainda é incompreensível a relação da maior concentração da *C. verticillata* (L.) da MQ20% e o aumento dos fibroblastos, pressupondo-se que a droga exacerba a proliferação. Deduz-se também que as concentrações do extrato vegetal e da quitosana nesta membrana MQ5% podem anular os efeitos indutores de fibroblastos, possível explicação para escassez dessas células em comparação com as outras membranas no mesmo período.

No 15º dia, os grupos MQ0%, MQ5% e MQ20% mostraram-se mais estimulados quanto aos fibroblastos jovens com alto grau de diferenciação. Estudos mostram que a ativação de células polimorfonucleares, migração de células gigantes, produção de citocinas, ativação de fibroblastos e estimulação da síntese de colágeno tipo IV são algumas atividades bioquímicas dos materiais à base de quitina no campo da cicatrização tecidual⁴². Além disso, a quitosana pode estimular a liberação de IL-8 por fibroblastos na fibroplasia, como tal, migração e proliferação de fibroblastos e células endoteliais^{23,43}. MQ0% e MQ20% estimularam pouco a proliferação de fibroblastos, diferente da MQ5% (dia 15). Para esta situação (MQ5%), concluiu-se que o aumento da concentração do extrato da planta não é diretamente proporcional ao aumento do número de fibroblastos jovens, nesse período.

No presente trabalho, foi observado que os fibroblastos (dia 30) foram escassos para MQ0% e MQ5% apresentando-se mais maduros e organizados no tecido recém-formado, dispostos paralelamente. Para a MQ20%, no mesmo período, o estímulo aumentou e relatou-se a presença de fibroblastos mistos e Matriz Extracelular (MEC) em formação.

Em outros estudos, onde foi analisado o efeito citotóxico da quitosana com pesos moleculares diferentes (120 kDa e 5 kDa) e mesmo grau de desacetilação (>90%) em queratinócitos humanos, os resultados demonstraram-se negativos na proliferação *in vitro* dessas células, além de induzirem a liberação de citocinas inflamatórias e participarem

diretamente e indiretamente de vias de sinalização de algumas Caspases⁴⁴. Entretanto, de acordo com o estudo de Howling et al.⁴⁵, utilizando quitosana de baixo, médio e alto peso molecular e diferentes graus de desacetilação ($37\% \leq 89\%$), observou-se que a quitosana de baixo e médio peso molecular e altamente desacetilada foram mais ativas que aquelas com menor grau de desacetilação e alto peso molecular na modulação da mitogênese de células da pele humana.

Ueno⁴⁶ e colaboradores avaliaram o efeito de membrana de quitosana/fibra de algodão com grau de desacetilação (18%) na aceleração da granulação em feridas experimentais abertas na pele em *beagles* para a fase inicial de cicatrização de feridas. Relatou-se que, na primeira semana, as feridas tratadas com quitosana mostraram infiltrado inflamatório grave com células polimorfonucleares (PMN) em comparado com o do grupo controle, acentuando-se à medida em que o tratamento com quitosana continuava. Os resultados mostram que a quitosana avaliada pode acelerar a infiltração de células PMN no estágio inicial da cicatrização de feridas. Diferente dos nossos resultados, que utilizaram para todas membranas de quitosana de médio peso molecular e grau de desacetilação alcalina de 90%, não foi observado uma intensa e progressiva proliferação de células PMN em nenhuma das amostras.

Um estudo análogo, preparou uma membrana de quitosana e testou sua eficácia como biomaterial para cobertura da ferida cutânea em ratos. Em seus resultados, observa-se que a membrana apresenta uma rápida hemostasia e cicatrização em uma semana. O exame histológico revelou altas taxas de epitelização e deposição de colágeno na derme⁴⁷. Tais conclusões se assemelham as deste estudo, revelando ferida cirúrgica totalmente fechada em sete dias, taxas de colágeno semelhantes ao do controle, ausência de edema e necrose para todos os grupos MQ0%, MQ5% e MQ20%, em todos os tempos.

De acordo com os estudos analisados, percebeu-se que a quitosana e o extrato vegetal desempenharam em algum ponto do processo de reparação tecidual a estimulação ou inibição de atividades biológicas. Assim, após os testes desta pesquisa, observou-se que as MQ0%, MQ5% e MQ20% apresentaram-se biocompatíveis. Em destaque a MQ20% que apresentou a ativação das fases de formação do tecido de granulação antecipado em relação às outras membranas até o dia 15 e, no dia 30, seu estímulo foi menor em relação às outras. Os fibroblastos foram estimulados prematuramente e de forma contínua além de ser considerável a presença da angiogênese, que foi decrescendo até o 30º dia.

5. CONCLUSÃO

As modificações químicas e físicas da quitosana influenciam sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, mas não se sabe até que ponto. Baseado nestes resultados foi possível concluir que MQ0%, MQ5% e MQ20% são biocompatíveis.

Os resultados mostraram que a membrana de Quitosana/ *C. verticillata* (L.) modulou a fase inflamatória, estimulou a proliferação de fibroblastos e melhorou a qualidade do tecido cicatricial. Portanto, as membranas Quitosana/ *C. verticillata* (L.) são biomateriais promissores para uso em aplicações de reparação tecidual.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos imensamente ao CERTBIO, ao laboratório de Patologia do Departamento de Patologia do curso de Veterinária da UFCG e ao LBio da UFCG pelo apoio dado à pesquisa, quanto à disponibilidade do laboratório, o fornecimento de produtos químicos e outros materiais.

REFERÊNCIAS

- [1] Williams DF. The Williams Dictionary of Biomaterials. Liverpool University Press; 2012.
- [2] Véronique M, eds. Biomaterials. Wiley-Blackwell; 2014.
- [3] Ghassemi T, Shahroodi A, Ebrahimzadeh MH, Mousavian A, Movaffagh J, Moradi A. Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. Archives of Bone and Joint Surgery. 2018; 6(2): 90.
- [4] Dawson E, Mapili G, Erickson K, Taqvi S, Roy K. Biomaterials for stem cell differentiation. Advanced Drug Delivery Reviews. 2008; 60(2): 215-228.
- [5] Wang Y, Guo X, Pan R, Han D, Chen T, Geng Z, Xiong Y, Chen Y. Electrodeposition of chitosan/gelatin/nanosilver: a new method for constructing biopolymer/nanoparticle composite films with conductivity and antibacterial activity. Materials Science and Engineering: C. 2015; 53: 222-228.
- [6] Dutta PK, eds. Chitin and chitosan for regenerative medicine. New York: Springer; 2016.
- [7] Rosendo RA. Desenvolvimento e caracterização de scaffolds de quitosana / *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis. [Dissertation]. Campina Grande: Federal University of Campina Grande; 2016.

- [8] Santos LF, Correia IJ, Silva AS, Mano JF. Biomaterials for drug delivery patches. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2018; 118: 49-66.
- [9] 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.
- [10] Rong G, Corrie SR, Clark HA. Biosensing in vivo: progresso e perspectivas. *Sensores ACS*. 2017; 2(3): 327-338.
- [11] Jennings JA, Bumgardner JD, eds. *Chitosan Based Biomaterials Volume 2: Tissue Engineering and Therapeutics*. United Kingdom: Woodhead Publishing; 2016.
- [12] 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 Part B: Applied Biomaterials*. 2015; 103(5): 1013-1022.
- [13] Drobnik J, de Oliveira AB. *Cissus verticillata* (L.) Nicolson and CE Jarvis (Vitaceae): Its identification and usage in the sources from 16th to 19th century. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 171: 317-329.
- [14] Braga TV. Avaliação da atividade farmacológica de *Cissus verticillata* Nicolson & CE Jarvis como antioxidante, antifúngico, hipoglicemiante e cicatrizante. [Dissertation]. Ouro Preto: Federal University of Ouro Preto; 2008.
- [15] 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.
- [16] Underwood W, Anthony R, Gwaltney-Brant S, Poison AS, Meyer R. eds. *AVMA guidelines for the euthanasia of animals: American Veterinary Medical Association*. Schaumburg; 2013.
- [17] Mescher, A, eds. *Junqueira's Basic Histology Text & Atlas (14th ed.)*. McGraw-Hill Education; 2016.
- [18] Júnior AR, Oliveira RD, Farias RE, Andrade LD, Aarestrup FM. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *An Bras Dermatol*. 2006; 81(2): 150-156.
- [19] You HJ, Han SK. Cell therapy for wound healing. *Journal of Korean medical science*. 2014; 29(3): 311-319.
- [20] Castro Garros I, Campos AC, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJ, Agulham MÂ, Araújo AC, Santis-Isolan PM, de Oliveira RM, de Moraes Arruda EC. Extrato de *Passiflora edulis* na

cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2006; 21; 55-65.

[21] Wang YC, Kao SH, Hsieh HJ. A Chemical Surface Modification of Chitosan by Glycoconjugates To Enhance the Cell– Biomaterial Interaction. *Biomacromolecules*. 2003; 4(2): 224-231.

[22] Hein S, Wang K, Stevens WF, Kjems J. Chitosan composites for biomedical applications: status, challenges and perspectives. *Materials Science and Technology*. 2008; 24(9): 1053-1061.

[23] Paul W, Sharma CP. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends Biomater Artif Organs*. 2004; 18(1): 18-23.

[24] Wang L, Khor E, Wee A, Lim LY. Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2002; 63(5): 610-618.

[25] 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.

[26] 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.

[27] Rodrigues AP. Produção e caracterização de membrana de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões. [Dissertation]. Campinas: State University of Campinas; 2008.

[28] Muzzarelli RA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*. 2009; 76(2): 167-182.

[29] 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.

[30] Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery*. 2004; 187(5): 11-16.

[31] Guo SA, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*. 2010; 89(3): 219-229.

- [32] Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*. 2014; 6: 265-276.
- [33] Kim YK, Guo Q, Packer L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology*. 2002; 172(2): 149-156.
- [34] Paper DH. Natural products as angiogenesis inhibitors. *Planta Médica*. 1998; 64(8): 686-695.
- [35] Quilez AM, Saenz MT, Garcia MD, De la Puerta R. Phytochemical analysis and anti-allergic study of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2004; 56(9): 1185-1189.
- [36] 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.
- [37] Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*. 2003; 23(4): 519-534.
- [38] Machado GH, Marques TR, de Carvalho TC, Duarte AC, de Oliveira FC, Gonçalves MC, Piccoli RH, Corrêa AD. Antibacterial activity and in vivo wound healing potential of phenolic extracts from jaboticaba skin. *Chemical biology & drug design*. 2018; Epub ahead of print.
- [39] Berry II DB, Sullins KE. Effects of topical application of antimicrobials and bandaging on healing and granulation tissue formation in wounds of the distal aspect of the limbs in horses. *American Journal of Veterinary Research*. 2003; 64: 88-92
- [40] Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*. 2013; 49(4): 780-792.
- [41] Venkatesan J, Kim SK. Compósitos de quitosana para engenharia de tecido ósseo - uma visão geral. *Drogas marinhas*. 2010; 8 (8): 2252-2266.
- [42] 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.
- [43] Saravanan S, Leena RS, Selvamurugan N. Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*. 2016; 93: 1354-1365.
- [44] Wiegand C, Winter D, Hipler UC. Molecular-weight-dependent toxic effects of chitosans on the human keratinocyte cell line HaCaT. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2010; 23(3): 164-170.

[45] Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*. 2001; 22(22): 2959-2966.

[46] Ueno H, Yamada H, Tanaka I, Kaba N, Matsuura M, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*. 1999; 20(15): 1407-1414.

[47] 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

O uso de biomateriais como alternativa terapêutica no tratamento de distúrbios fisiológicos e teciduais são opções viáveis disponíveis para aplicações biomédicas. Os materiais à base de quitosana são estudados há mais de sete décadas e são comprovadamente viáveis no tratamento de doenças inflamatórias. Pesquisas com testes *in vivo* são fundamentais para definir a viabilidade de um novo material. O teste de biocompatibilidade em animais permite o contínuo estudo do biomaterial para que sejam realizados posteriormente testes clínicos.

As membranas de Quitosana/ *C. verticillata* (L.) apresentaram promissores resultados, mostrando que o biomaterial deve ser estudado em busca de mais análises juntamente com os estudos de sua interação com os sistemas biológicos assim como sua bioquímica, degradação, interação celular e interação farmacológica.

ANEXO

Anexo – Normas para publicação

**Form and preparation of manuscripts**

Language and style: All submissions should be in English, double spaced and typed on an A4 (209 x 296 mm) paper, with Times New Roman font-size 12, and with ample (~2.5 cm) top, bottom and left-hand margins. In general, the typescript for articles should follow the conventional form: title, authors' names and complete affiliations, abstract, introduction, literature review, experimental, simulation or calculation procedures, results and discussion, conclusions, acknowledgments, references, tables, figure captions, and figures.

Letters are restricted to reports of unusual urgency, significance or interest, and should be limited to 1000 words or the equivalent. A statement from the authors as to why the manuscript meets these criteria will be helpful to the Editor. Letters will not be accepted if, in the opinion of the Editor, the principal content has previously been released or publicized in any other published medium. In estimating the length of a Note, an average sized figure is counted as 100 words and separate formulae and lines of a table are counted as 8 words per line, including headings and horizontal rulings. The title, authors' names, and literature references are not counted.

Title: This should be brief and convey the contents of the paper.

Abstract: An Abstract in English must be included. It should be short, not more than 150 words for an Article and 50 words for Letters, and should contain numerical and factual data only.

Keywords: The authors should indicate a minimum of three keywords.

Illustrations: All necessary illustrations should be submitted with at least 300 dots per inch (600 dpi recommended). Graphs and diagrams should be consecutively numbered in Arabic numerals in the order in which they appear in the text. The submitted illustrations will be reduced and directly reproduced in the published paper, so authors should take particular care to ensure that all lettering of an illustration (particularly the smallest ones) are clearly legible. Figures should be sent in .jpg/jpeg, .tif, .png, etc file format. Images in .doc or .pdf files are

compressed and this makes them lose resolution, which is why it is so important that they are sent in separate files. Complex or multi-panel figures (namely with (a) and (b)) should be sent in one file instead of separated (example).

Tables: Each table should be typed or printed on a separate sheet, and should have a caption in addition to its sequence number.

Photographs: Photographs should be submitted with at least 300 dots per inch (600 dpi recommended), high contrast and positive. When necessary, the scale should be drawn on the photograph itself, and not below. Color photographs may be published at additional cost.

Captions for figures: These should give sufficient information to make the illustration comprehensible.

Bibliography: The references should be in accordance with the standard Vancouver (see examples below). Reference numbers in the text should be typed as superscripts without parentheses. The literature cited should be printed on a separate page (double-spaced), and should be listed in the order in which it appears in the text.

Articles:

- Chiu KY, Cheng FT, Man HC. Laser cladding of austenitic stainless steel using NiTi strips for resisting cavitation erosion. *Materials Science and Engineering: A*. 2005;402(1-2):126-134.
- Sun GF, Zhang YK, Zhang MK, Zhou R, Wang K, Liu CS, et al. Microstructure and corrosion characteristics of 304 stainless steel laser-alloyed with Cr-CrB₂. *Applied Surface Science*. 2014;295:94-107.
- Srivastava U, Kawatra SK, Eisele TC. Study of organic and inorganic binders on strength of iron oxide pellets. *Metallurgical and Materials Transaction B*. 2006 Nov 15. [Epub ahead of print]

Books:

- Khatak HS, Raj B, eds. *Corrosion of Austenitic Stainless Steels: Mechanism, Mitigation and Monitoring*. Cambridge: Woodhead Publishing; 2002.

Book chapter:

- Michot LJ, Villieras F. Surface area and porosity. In: Bergaya F, Theng BKG, Lagaly G, eds. Handbook of Clay Science. Amsterdam: Elsevier; 2006. p. 965-978.

Proceedings:

- Nagaya Y, Nurase M, Mizuyama S, Hattori S. Evaluation of incipient cavitation erosion for pipe wall at downstream of an orifice. In: Proceedings of the 7th International Symposium on Cavitation; 2009 Aug 16-20; Ann Arbor, Michigan, USA. p. 1-5.

Thesis:

- Mantovani MC. Comportamento a frio e a quente de pelotas auto-redutoras de resíduo de aciaria elétrica. [Dissertation]. São Paulo: Polytechnic School of University of São Paulo; 1998.

Peer Review: The articles will be evaluated by at least two reviewers, Brazilian or foreign researchers, of proven scientific reputation, invited by the editors according to their field of knowledge. After corrections and reassessment, articles will be accepted if they have two favourable opinions, and are rejected when they receive two unfavourable opinions. In specific cases, the editor may decide to accept or reject an article based on only one opinion if it is well founded.

Function of Referees: The Editor seeks the advice of experts in the research areas of the submitted manuscripts. Referees should estimate the originality, soundness and scientific value of the work, together with some basis for their opinion. They should also indicate whether the writing is clear and concise. Improperly used space merely restricts the amount of useful material which can be published. The Editor, who accepts full responsibility for decisions about manuscripts, may not always follow the recommendations from the referees. Papers which are not accepted by the Editor will be returned to the authors, and there will be no communication about them with the editors of other journals.

General Considerations: Authors should present their materials with the utmost conciseness and clarity. Extensive reviews of the literature cannot be accepted, however, the state-of-

art on the specific subject covered by the article must be clearly stated. Well-known procedures should either be designated by name or literature references. Notes acknowledging technical assistance for the research or indicating presentation at a meeting should be brief. The name of the author to whom inquiries about the paper may be addressed should be marked with an asterisk. The authors' official titles should not be included. The submitting author must provide an ORCID ID (Open Researcher and Contributor ID, <http://orcid.org/>) at the time of submission by entering it in the user profile in the submission system. We strongly encourage coauthors to do the same. Introductions should contain only enough background material to show why the work was done and why it is worth publishing. This information should also be addressed in the cover letter sent to the editor.

Experimental results are of lasting value and should be clearly and logically presented in a separate section. Results and discussions should be sequential. The addition of a final section at the end of the paper, which briefly summarizes the main conclusions of the work, is recommended.

General Instructions: Contributions will only be considered for publication when submitted in our online submission website located at <https://mc04.manuscriptcentral.com/mr-scielo>. File types accepted for submission: .doc and .docx to manuscripts and .jpg/jpeg, .tiff and .png to images. The first page should contain the title and authors' names and addresses, the title, the abstract and the keywords. The text should start on the second page. All pages of the manuscript should be numbered consecutively, including references and notes, tables, figure captions and figures, which should be presented in this sequence. The submission should also include the original graphs, drawings of apparatus, and structural formulae. The authors should indicate in the text itself or in marginal notes in the typescript where the tables and figures are to be inserted.

The attention of contributors is particularly directed to the requirement that all nomenclature should be consistent, clear, unambiguous, and conform to the rules of nomenclature established by the International Union of Pure and Applied Chemistry, the International Union of Biochemistry, the Abstracts Service (see Index Guide to Chemical Abstracts, 1987), the Nomenclature Committee of the American Chemical Society, or other appropriate bodies.

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

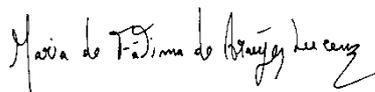
A: Prof. Dra. **Luanna Abílio Diniz Melquíades de Medeiros**

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 B – Protocolo para eutanásia de ratos da UOSC.

	UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA			POP nº 013
	Procedimento Operacional Padrão (POP)			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 CO₂, 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** – Anestésiar 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.