

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

**FRANCILEIA NOGUEIRA ALBINO CALLAND**

**AVALIAÇÃO DE HIDROGEL FIBROSO NO PROCESSO DE  
REPARAÇÃO DE LESÃO CIRÚRGICA EM MODELO DIABÉTICO EM  
RATOS**

**EVALUATION OF FIBROUS HYDROGEL IN THE PROCESS OF  
SURGICAL LESION REPAIR IN A DIABETIC MODEL IN RATS**

São Paulo - SP  
2022

**FRANCILEIA NOGUEIRA ALBINO CALLAND**

**AVALIAÇÃO DE HIDROGEL FIBROSO NO PROCESSO DE  
REPARAÇÃO DE LESÃO CIRÚRGICA EM MODELO DIABÉTICO EM  
RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Prof. Dr. Anderson Oliveira Lobo

Prof(a). Dr(a). Francilio de Carvalho  
Oliveira

Cidade - SP

2022



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

C16a CALLAND, Franciléia Nogueira Albino.

Avaliação de hidrogel fibroso no processo de reparação de lesão cirúrgica em modelo diabéticos em ratos / Franciléia Nogueira Albino Calland -- São Paulo: Universidade Brasil, 2023.

90 f.: il.

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

Orientação: Prof. Dr. Anderson Oliveira Lobo.

Coorientação: Prof. Dr. Francilio de Carvalho Oliveira.

1. Hidrogel. 2. Diabete Mellitus. 3. PGel. 4. Fibroblastos. I. Lobo, Anderson Oliveira. II. Oliveira, Francilio de Carvalho. III. Título.

CDD 610.28



**UNIVERSIDADE  
BRASIL**

## TERMO DE APROVAÇÃO

**ANDERSON DE OLIVEIRA LOBO**

### **"AVALIAÇÃO DE HIDROGEL FIBROSO NO PROCESSO DE REPARAÇÃO DE LESÃO CIRÚRGICA DE PELE DE RATAS DIABÉTICAS"**

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

Prof(a). Dr(a) Anderson de Oliveira Lobo (presidente-orientador)

Prof(a). Dr(a) Fernanda Roberta Marciano (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a) Priscila Pereira Fávero (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a). Jancineide Oliveira de Carvalho (CENTRO UNIVERSITÁRIO  
UNINOVAFAPI)

Prof(a). Dr(a). Antônio Francisco Machado Pereira (UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PIAUÍ)

São Paulo, 07 de dezembro de 2022.  
Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Anderson de Oliveira Lobo

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

---

---

---



**UNIVERSIDADE  
BRASIL**

### Termo de Autorização

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

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

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

**Título do Trabalho: "AVALIAÇÃO DE HIDROGEL FIBROSO NO PROCESSO DE REPARAÇÃO DE LESÃO CIRÚRGICA DE PELE DE RATAS DIABÉTICAS".**

#### **Autor(es):**

Discente: **Franciléia Nogueira Albino Calland**  
Assinatura: Franciléia Nogueira Albino Calland

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Anderson de Oliveira Lobo**

Assinatura: Anderson de Oliveira Lobo

Coorientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Francilio de Carvalho Oliveira**

Assinatura: Francilio de Carvalho Oliveira

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

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Data: 07/12/2022

Campus Itaquera  
Rua Carolina Fonseca, 584, Itaquera - São Paulo/SP | 08230-030  
Central de Relacionamento com o Aluno - 08007807070  
[www.ub.edu.br](http://www.ub.edu.br)

## **DEDICATÓRIA (opcional)**

Folha que pode ser utilizada para dedicar o trabalho a alguém.

## **AGRADECIMENTOS (opcional)**

A Deus toda honra e toda glória!

“Aqueles que passam por nós. Não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

Primeiramente, agradeço meu orientador Prof Dr: Anderson Lobo, obrigada pela sua disponibilidade sempre em conduzir comigo a construção desta tese, por sua paciência e por nunca me deixar desanimar ao longo desses cinco anos. Manifesto aqui também minha gratidão ao meu coorientador Prof Dr Francilio Oliveira, que juntos construímos momentos desafiadores de toda parteprática dos experimentos.

Manifesto meu respeito e agradecimento ao querido amigo de todas as horas, que teve um papel importantíssimo na construção da tese, Guilherme Brito, biomédico que fez parte de um grupo de técnicos, professores e colaboradores do Centro Universitário Uninovafapi, instituição que deu o grande apoio e incentivo a minha qualificação.

Meus respeitosos agradecimentos a banca de qualificação, com sua contribuição para o meu crescimento e aos membros da banca de defesa por aceitarem este convite e contribuir assim na construção deste trabalho.

Por fim, agradeço em especial àqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente, que apostaram em mim, mas do que ninguém e seguramente são os que mais compartilharam das lutas e da minha alegria: minha filha Camila, minha dose diária de amor e meus familiares e amigos que em todo tempo tive seu apoio incondicional.

Obrigada!

**FOLHA DESTINADA À EPÍGRAFE (opcional)**

*“citação de um autor de sua preferência...”*

(AUTOR, ANO)

*(Este autor deve constar nas Referências)*

## RESUMO

**Introdução:** Diabetes Mellitus é uma doença causada pela insuficiência da produção de insulina ou má absorção desta, no qual desencadeia diversas consequências, dentre elas está a má cicatrização de feridas, como o tratamento é limitado, requer novas opções. O GelMA é um hidrogel fotopolimerizável não citotóxico e biodegradável sendo a gelatina um colágeno hidrolisado degradado, um dos componentes mais abundantes da matriz extracelular (MEC), vem sendo estudado como opção no tratamento de cicatrização de feridas. **Objetivo:** Produzir scaffolds a base de policaprolactona modificada com gelatina metacrilatada para regeneração tecidual de pele de pé diabético. **Materiais e métodos:** Foram testados quatro tipos de hidrogéis em ratos previamente induzidos a diabetes, foram separados em 05 grupos, grupo controle, grupo G10%, grupo P12%, grupo PCM, grupo PGel. A contagem de fibroblastos foi realizada em lâminas coradas com o método HE, proveniente das áreas lesionadas no 7º e 14º dia, nas lâminas coradas foram contados o número de fibroblastos. A coloração de Picosirus Red (PSR) foi utilizada para detectar a presença ou não de colágeno, já a microscopia eletrônica de varredura foi usada para proporcionar conhecimento no que concerne a dimensão, forma e arranjo das partículas. **Resultados e discussão:** Dentre os hidrogéis testados no 7º dia de protocolo, o grupo P12% e PCM obtiveram maior significância estatístico número de fibroblastos encontrados, comparados ao PGel e G10%, já no 14º diao hidrogel que houve um maior número de fibroblastos encontrados foi o grupo PGel. Os fibroblastos são células essenciais presentes no encadeamento da cicatrização, dessa forma, acredita-se que curativos a base dessas substâncias possam auxiliarno tratamento de feridas de pacientes com DM (Diabetes Mellitus). **Conclusão:** O grupo que teve melhor desempenho foi o PGel com base nos resultados apresentados quanto a quantidade de fibroblastos, bem como na quantidade de colágeno tipo III e tipo I, desta maneira, sugerindo um efeito benéfico na modificação deste material para aplicações voltadas a regeneração tecidual.

**Palavras-chave:** Hidrogel, Diabete mellitus, PGel, fibroblastos

## ABSTRACT

Introduction: Diabetes Mellitus is a cure for infections, as treatment is limited, treatment of this disease, consequences they are poor wound healing, as treatment is limited, treatment of this disease. GelMA is a non-toxic and biodegradable photopolymerizable hydrogel being a degraded hydrolyzed collagen, one of the most abundant components of the extracellular matrix (ECM), has been studied as an option in the treatment of wound healing. Objective: To produce a methacrylate base for diabetic foot skin modified with a methacrylate gelatin base for diabetic foot tissue skin. Materials and methods: Four types of hydrogels were tested in rats, previously defined in 5 groups of hydrogels, were defined in 5 control groups, G10% group, P1 group, PCM group, PGel group. Fibroblast counting was performed on slides stained with the HE method, from the injured areas on the 7th and 14th day, on the stained slides the number of fibroblasts was counted. The collection of Picrosirius Red (PSR) was used to detect the presence or not, as a scanning electron microscopy was used to provide information about the size, shape and arrangement of the particles. Results and discussion: Among the hydrogels tested on the 7th day of the protocol, the P12% and PCM groups obtained greater statistical significance in the number of fibroblasts found, compared to PGel and G10%, on the 14th day the hydrogel had a greater number of fibroblasts found for the PGel group. Fibroblasts are the main cells that do not present any healing process, so it is believed that dressings based on these cells can help in the treatment of wounds in patients with DM. Conclusion: The group that performed better for PCL-modified/GEL based on the results presented the amount of fibroblasts, as well as the amount of collagen type III and type I, in this way, suggesting a beneficial effect in the material change for applications.

**Keywords:** Hydrogel, Diabetes mellitus, PGel, fibroblasts

## **DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO**

Dentre os materiais utilizados para o teste, foi identificado resultado positivo em todos os materiais testados, ainda foi possível notar que alguns materiais possuíram maior capacidade de adesão e maior desenvolvimento celular, bem como meios propícios para maior cicatrização das feridas dos ratos diabéticos, isso significa que, acredita-se que os materiais testados possam contribuir para o tratamento de feridas ocasionadas pela DM (Diabetes Mellitus).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Morfologia das nanofibras eletrofiadas obtidas por varredura eletrônica microscopia (SEM): (a) GeIMA, (b) PCL, (c) PCLMA e (d) PCLMA:GeIMA .....40

Figura 2 – O diâmetro médio das fibras obtidas medido para todos os grupos. Os valores são expostos como média  $\pm$  SD, N = 100. ANOVA one-way ( $p < 0,05$ ) seguido por um teste de comparações múltiplas de Tukey .....41

Figura 3 - Figura ilustrativa dos cortes e do implante dos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis modelo experimental em *Rattus novergicus*. ..... 44

Figura 4 - Número de fibroblastos encontrados nos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis no 7º dia de protocolo experimental modelo de indução da diabéticos em *Rattus novergicus* .....45

Figura 5 - Número de fibroblastos encontrados nos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis no 14º dia de protocolo experimental modelo de indução da diabéticos em *Rattus novergicus*. .....46

Figura 6- Porcentagem da área total de colágeno encontrados no 7º e 14º dia de protocolo experimental nos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis modelo de indução da diabéticos em *Rattus novergicus*..... 47

Figura 7 - Porcentagem da área de colágeno tipo I encontrados no 7º e 14º dia de protocolo experimental nos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis modelo de indução da diabéticos em *Rattus novergicus*. ..... 48

Figura 8 - Porcentagem da área de colágeno tipo III encontrados no 7º e 14º dia de protocolo experimental nos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis modelo de indução da diabéticos em Rattus novergicus.....48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Média dos valores de glicemia dos animais tratados em 7 e 14 dias..... 42

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS (Opcional)

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
<i>B.cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
DMA	Análise dinâmico-térmica mecânica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
	2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
<b>3</b>	23	
3.1	23	
3.2	24	
3.3	27	
3.4	30	
3.5	33	
<b>4</b>	36	
4.1	36	
4.5.1	38	
4.5.2	38	
4.5.3	38	
4.6	39	
4.7	40	
4.8	40	
<b>5</b>	41	
<b>6</b>	51	
<b>7</b>	57	
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>58</b>
	<b>APÊNDICE A – Imagens das lâminas histológicas por coloração H&amp;E no 7º e 14º dia de tratamento</b>	<b>69</b>
	<b>APÊNDICE B – Imagens de microscopia polarizada e não polarizada no 7º e 14º dia de tratamento</b>	<b>70</b>
	<b>ANEXO A - Parecer da comissão de ética no uso de animais – ceua uninovafapi</b>	<b>71</b>

<b>ANEXO B - Artigo submetido a materials letters</b>	
.....	72
<b>ANEXO C - Artigo publicado em anexo</b>	74

## **1 INTRODUÇÃO**

Diabetes Mellitus é uma doença que tem como causa a insuficiência da produção de insulina ou má absorção desta. Devido a isso, pode levar a hiperglicemia e aumentar as taxas de comprometimento cardíaco, arterial, visual, renal e neurológico, que podem ocasionar óbito em casos graves (KATSAROU et al.,2017)

De acordo com dados da International Diabetes Federation até o ano de 2017, 8,8% da população mundial entre 20 a 79 anos convivia com diabetes. Projeta-se para o ano de 2045 o número absoluto de 628,6 milhões de pessoas vivendo com a doença (BRASIL, 2019; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES; 2020).

No Brasil, segundo dados da Sociedade Brasileira de Diabetes, aproximadamente 13 milhões de indivíduos convivem com diabetes mellitus, esse valor corresponde a um percentual de 6,9% da população nacional. Nota-se ainda que há diferenças no diabetes tipo 1 e tipo 2 quanto à taxa de incidência. Para o diabetes tipo 1, nota-se aumento de incidência relacionado a faixa etária de indivíduos com menos de 15 anos de idade, pontuando 7,6 para cada 100 mil habitantes, a nível mundial, em 2017, surgiram 132 mil casos novos por ano na faixa etária de 0 a 19 anos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2020).

Entretanto, é diferente para o diabetes tipo 2, no qual nota-se aumento de incidência após a terceira década de vida. No Brasil, essa patologia também está associada a um grande número de complicações, principalmente crônicas, como insuficiência renal, amputação de membros e doenças cardiovasculares (NUNES et al., 2019).

Dentre as consequências associadas a doença, a má cicatrização de feridas é uma das complicações mais prevalentes que se desenvolvem a partir de contaminação cruzada, podendo causar úlceras crônicas não cicatrizantes que resultam em infecção (HE et al., 2017). As úlceras são feridas não cicatrizantes caracterizadas por uma inflamação crônica devido a diversos fatores como a

neuropatia, oxigenação inadequada, insuficiência vascular nas extremidades e infecção bacteriana (DEVALLIERE et al., 2017).

Embora exista uma variedade de regimes e protocolos de tratamento em feridas, as eficiências terapêuticas ainda são muito limitadas (HE et al., 2017). Os métodos utilizados para cicatrização dessas úlceras incluem o uso de antibióticos, curativos e tratamento hiperbárico. Sabe-se que o uso de cada tipo de tratamento depende da condição do paciente, característica da ferida e microambiente, sendo critérios de importância ao se escolher o tratamento correto e o material adequado (SINGLA et al., 2017).

Os protocolos e materiais citados apresentam ótimos resultados de cicatrização de feridas, contudo os métodos utilizados apresentam limitações, por exemplo, o uso de antibióticos, como o becaplermin (Regranex™), o fármaco pode estar associado ao desenvolvimento de outras doenças e gerar maior risco de mortalidade (CHANG, 2016). Outra prerrogativa que limita o tratamento é a viabilidade econômica que é o caso dos enxertos onde sua aplicação é limitada devido ao seu alto custo, rejeição imune, necessidade de cuidados extensivos e dificuldade em recuperar as funcionalidades completas da pele (SINGLA et al., 2017). Essas limitações acabam agravando a acessibilidade do paciente.

Um dos principais problemas associados ao tratamento de tecido é o fornecimento suficiente de oxigênio e nutrientes para atender às demandas de células (GHOLIPOURMALEKABADI et al., 2016). Sendo que a distribuição de nutrientes adequada e homogênea, especialmente o oxigênio, facilita a migração celular, a neovascularização e o crescimento de tecido, esses fatores não ocorrem facilmente em pessoas com úlceras crônicas, pois a má circulação ocasionada por defeitos e integridade dos vasos sanguíneos são os principais fatores pela má oxigenação das partes periféricas (pés) resultando na UPD (GHOLIPOURMALEKABADI et al., 2016; ADEGHATE et al., 2017).

Estudos sugerem a aplicação de metacrilato de gelatina (GelMA). O GelMA é um hidrogel fotopolimerizável não citotóxico e biodegradável modificado com grupos metacrilato, ou seja, um hidrogel composto por gelatina modificada com o anidrido metacrílico e é um biomaterial atraente para estudos de células e aplicações de engenharia de tecidos (ADKAZEMZADEH-NARBATET et al., 2017). Pode ser sintetizado por conjugação de grupos de metacrilato aos grupos que contêm amina de gelatina natural (RAMÓN-AZCÓN et al., 2012). Sendo a gelatina um colágeno

hidrolisado degradado, um dos componentes mais abundantes da matriz extracelular (MEC) (HASSANZADEH et al., 2016).

O metacrilato de gelatina (GelMA) tem sido utilizado por vários pesquisadores em diversos tipos de tratamentos, especialmente como propostas de curativos (ASSMANN et al., 2017, ANNABI et al., 2017; RIZWAN et al., 2017; ZHAO et al., 2017). Diante de todas as aplicações do GELMA destaca-se o estudo de Alemdar (2016) sobre a síntese de um hidrogel gerador de oxigênio formado pela combinação de GelMA com peróxido de cálcio (PC-Gelma) para fornecer oxigênio a células cardíacas em condições isquêmicas, o resultado apresentou um aumento na viabilidade celular.

Para solucionar o problema de má oxigenação de pacientes diabetes com lesões, este projeto propõe desenvolver curativos de multiresposta a base de hidrogéis para tratamento de feridas de difícil processo de reparação utilizando materiais aprovados no FDA. Para isso será proposto um biomaterial cicatrizante através de GelMA, Policaprolactona pela técnica de eletrofiação, avaliando seu desempenho antimicrobiano e potencial regenerativo de feridas crônicas de difícil processo de regeneração.

## 2 OBJETIVOS

Produzir scaffolds a base de policaprolactona modificada com gelatina metacrilatada para regeneração tecidual de pele de pé diabético.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modificar estrutura da gelatina suína, produzindo GelMA;
- Alterar a estrutura das nanofibras eletrofiadas de PCL formando PCL modificado;
- Obter curativos eletrofiados de GelMA e PCL modificado;
- Investigar a morfologia das fibras obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura;
- Aplicar os curativos para estudo da cicatrização de feridas em modelo diabético in vivo induzido por Streptozocin;
- Analisar por método microscópico (histomorfométrico), a deposição de colágeno tipo I e III nas feridas em diferentes períodos experimentais (7 e 14 dias);
- Comparar por meio de análise histológica o processo de reparo das feridas pela quantificação de fibroblastos em diferentes períodos experimentais (7 e 14 dias).

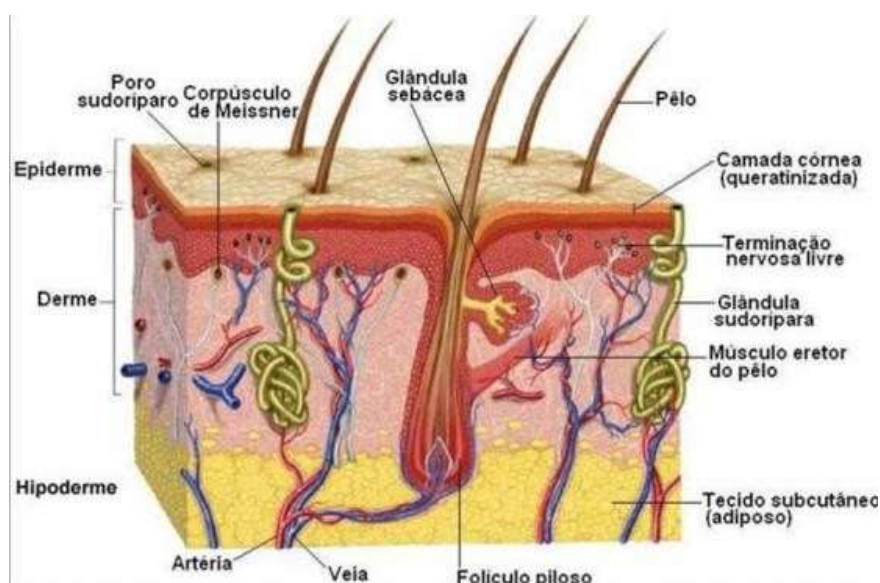
### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A PELE

Todo o corpo é coberto por pele, desta forma para (ARNOLD, 1994), ela também é um órgão que oferece proteção e atua na eliminação de resíduos, a pele é também um órgão sensorial, que recebe e conduz estímulos. Para Oliveira, Torquete, Nascimento (2020), a pele possui diversas funções com ênfase na atuação “como barreira para bactérias e diversas doenças (proteção imunológica)”. Ainda de acordo com os autores, ela atua protegendo o corpo de traumatismos, regulando a temperatura corporal, mantendo o equilíbrio hídrico e eletrolítico, sendo fonte de identificação de sensações dolorosas, ou agradáveis, além de atuar na síntese de vitamina D.

Para Rivitti, (2018), a pele é responsável por mais de 15% do peso do corpo, sendo indispensável ao ser humano, por atuar isolando os componentes orgânicos do meio exterior, apresentando variações de acordo com sua localização podendo ser flexível ou rígida.

**Figura 1** - Ilustração representativa das camadas e componentes da pele



A epiderme “(do grego epi = acima; derma = pele) é a camada mais superficial e também a mais importante da pele”. (CESTARI, 2012, P.10). A epiderme conta com cinco camadas, que são a camada basal (estrato germinativo), composta por células cúbicas que se multiplicam continuamente, localiza-se na camada mais interna próximo a derme, essa camada também acumula queratina, ou seja é queratinócito e suas células são cilíndricas com citoplasma basófilo e núcleos

grandes, alongados, ovais e hipercromáticos, em constante divisão mitótica. (CESTARI, 2012).

A camada espinhosa, possui de 9-10 camadas de células, contendo células poliédricas, possuem prolongamento no citoplasma, que se estendem para fora conectando-se a células vizinhas por desmossomos. (GOMES, 2021.). A camada granulosa, consiste em 3-5 camadas de células em que a aparência dos queratinócitos muda radicalmente. O estrato lúcido é composto por diversas camadas de células achatadas, diretamente ligadas e em sua maioria apresenta limites diferentes que perdem todas as suas inclusões citoplasmáticas. (GHELLERE, 2020). A camada córnea tem espessura bastante variável e é composta por células achatadas, mortas e anucleadas. (SIQUEIRA, 2019)

A função da derme é proteger e de sustentar, é nela também que se formam as glândulas sebáceas e os folículos pilosos, ela possui fibras colágenas, elásticas e reticulínicas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Sua responsabilidade é nutrir a epiderme, visto que ela exige sucessivas reposições de nutrientes indispensáveis para manter a atividade mitótica. (IRION, 2005).

A derme possui duas camadas distintas: o estrato papilar e o estrato reticular. A primeira é mais superficial e delgada, enquanto a segunda é mais profunda e mais espessa. Nesta camada da pele, podem ser encontrados diversos tipos celulares como: mastócitos, fibroblastos, plasmócitos e macrófagos. Todavia, vale enfatizar que os fibroblastos são considerados a principal linhagem celular dessa região da pele e tem a função de sintetização de colágeno, elastina e substância fundamental amorfa para formação da matriz extracelular, além de reparar a pele lesionada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

A hipoderme (tecido subcutâneo) tem a função semelhante a um amortecedor para a derme e a epiderme. Nela, podem ser encontradas fibras de elastina e colágenas provindo da derme que se movimentam entre as células gordurosas acumuladas e, assim, formam uma conexão entre as camadas superficiais e subcutâneas da pele (GOMES et al., 2016; CLIVATTI et al., 2015). Devido a dimensão e distribuição anatômica da pele, a hipoderme é exposta a frequentes agressões ambientais, acarretando, assim, na descontinuidade do tecido.

### 3.2 PROCESSO DE REPARAÇÃO DO TECIDO

De acordo SOBEST (2020), a ferida é representada por “perda da integridade da pele (ferimento) por causas externas (traumas ou cirurgias), ou por causas internas ou endógenas, relacionadas a doenças facilitadoras ou causadoras da ferida.” Ela também pode ser entendida como a interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, seja em maior ou menor extensão e a sua reparação torna-se crucial para a sobrevivência. O manejo correto de ferimentos deve ser feito com a desinfecção, debridamento e provisão de um ambiente úmido que estimule o estabelecimento do local para que ocorra o processo natural de cicatização (ARNOLD Jr. et al., 1994).

Consoante à sua classificação, as feridas podem ser vistas quanto: ao agente causador em incisa ou cortante; contusa; lacerada; perfurante; penetrante; escoriação; térmica ou queimadura; patológica; iatrogênica, amputação. Elas também são classificadas quanto à sua etiologia: aguda ou crônica (PEREIRA,2018).

As feridas simples respondem de forma rápida ao tratamento padrão, porém os ferimentos graves e extensos, sejam eles provocados por queimaduras, abrasão da pele, avulsão de tecidos, úlcera ou perda pós-necrótica de tecidos cutâneos, necessitam de um tratamento mais especializado até que haja completa cicatrização da lesão, em que há formação de tecido de granulação das áreas mais profundas (JUNIOR et al., 2018). Vale salientar que em qualquer fase da vida a pessoa pode ser acometida por feridas.

Nascimento (2019) menciona em sua pesquisa que cerca de 3% da população brasileira possui algum tipo de lesão crônica; 2,7% apresentam úlceras crônicas nos pés e pernas, porcentagem que alcança 10% nas pessoas com diabetes, representando a segunda causa de afastamento do trabalho no Brasil. Por outro lado, é importante se observar que devido a pesquisas isoladas e a escassos registros existentes, pode haver possibilidade de que os dados estatísticos não retratem fidedignamente o sério problema de saúde pública que as feridas crônicas representam (SANTOS et al., 2020).

Destarte, salienta-se que ao surgir a ferida cutânea, deve-se iniciar de imediato o processo de cura da lesão cutânea por cicatrização. Esse é um processo bioquímico e fisiológico que objetiva recriar a plenitude do tecido lesionado, através de respostas e/ou interações celulares e moleculares, de forma harmoniosa e simultânea (MARTELLI et al., 2016).

Antes da cicatrização, a ferida passa pela fase inflamatória em que acontece várias reações locais e sistêmicas oriundas da interação celular e vascular. Nessa etapa, também acontece a descontinuação de vasos sanguíneos devido a agressão do processo inflamatório, que logo é minorado porque o organismo se manifesta frente a esse evento com a diminuição do fluxo sanguíneo por meio de vasoconstrição e formação de coágulo, evitando que haja mais perda de sangue (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Nesse contexto, vale salientar que o aumento da permeabilidade vascular ocorre devido à vasodilatação promovida por mediadores químicos locais, que favorecem a quimiotaxia leucocitária, originando o processo inflamatório agudo e o surgimento dos sinais característicos da inflamação, tais como (dor, calor, rubor, tumor e perda de função) (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Pari passu, antes de se alcançar a cicatrização, os neutrófilos que estão envolvidos no controle da infecção e aumento da permeabilidade vascular são as primeiras células inflamatórias atraídas pelos fatores quimiotáticos (IBRAHIM et al., 2018). Como eles são responsáveis pela defesa do organismo e possuem vida média curta, ao eliminarem os contaminantes da ferida, dão lugar aos macrófagos, importantes no processo imunitário. Essas células liberam fatores de crescimento como interleucina 1 (IL-1), fator transformador alfa (TGF- $\alpha$ ), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), entre outros que estimularão a formação de novos vasos sanguíneos, assim como das células endoteliais que propagarão a deposição de tecido conjuntivo neoformado e a migração de queratinócitos, acelerando a reepitelização da lesão (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Assim, os macrófagos são importantes agentes na transição da fase inicial da resposta inflamatória para as fases seguintes da cicatrização, pois eles atuam na eliminação de corpos estranhos ao organismo. Na fase proliferativa, ocorre a reparação do tecido conjuntivo com formação do tecido de granulação e do epitélio, dessa forma, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é produzido de forma intensa e atua de forma a promover o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos já existentes, com posterior restabelecimento da circulação local, necessária para a oxigenação e nutrição dos tecidos (IBRAHIM et al., 2018).

Por conseguinte, tem-se a proliferação vascular em que também ocorre a fibroplasia que é o processo de recrutamento de fibroblastos das margens da ferida

e consequente produção de colágeno (um principal componente da pele) por essas células, como também secretam elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e ácido hialurônico, contribuindo para o êxito da cicatrização (MARTELLI et al., 2016).

As células em proliferação, juntamente com as proteínas produzidas por elas e os novos vasos formados darão origem ao tecido de granulação, última etapa da fase de cicatrização, eles também terão a finalidade de nutrir os novos tecidos (ISAAC et al., 2012). O tecido de granulação é o sinal macroscópico da deposição de tecido conjuntivo no leito da ferida e possui coloração avermelhada e aspecto granuloso (GONZALEZ et al., 2016).

Salienta-se que o processo de reepitelização se inicia horas após o surgimento da lesão, com a reconstituição das células epiteliais no tecido estratificado que cobrirá a ferida restaurando a função da pele. Consoante as feridas superficiais, as células epiteliais migram das margens da lesão, bem como de seus anexos (folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas), enquanto que nas feridas profundas, onde há destruição dos anexos, ocorre migração apenas das células das bordas (PEREIRA, 2018).

Após a reepitelização, inicia-se a fase de remodelagem. Essa é a fase em que acontece uma “tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal, marcada por maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular, ocorrendo o depósito de proteoglicanas e colágeno” (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009, [n.p]). Ela também pode ser considerada a última do processo de cicatrização de uma ferida, em que ocorre de maneira lenta, podendo se prolongar por meses ou anos (GONZALEZ et al., 2016).

Destarte, a remodelação do colágeno inicia-se a partir do momento em que começa a formação do tecido de granulação e se mantém por meses após a recobertura da ferida por um novo tecido epitelial. Esse processo é dividido nas seguintes etapas: produção, deposição, digestão e reorganização. O tecido de granulação vai sendo enriquecido com mais fibras de colágeno e, a partir desse processo, já é possível se observar o aspecto de cicatrização. Acentua-se, outrossim, que quanto mais fibras de colágeno, mais resistente é a cicatriz, porém, inicialmente o seu depósito é feito de maneira aleatória, orientando-se pela organização da fibronectina, obedecendo a direção e natureza das tensões aplicadas ao tecido e que a resolução completa de uma ferida, somente pode ser considerada após concluída a maturação e remodelagem da matriz extracelular e o

seu processo de conclusão pode ir de meses a anos (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Por conseguinte, essas fibras são digeridas pela colagenase que é produzida por macrófagos, fibroblastos, leucócitos e células epiteliais. Em seguida, elas são resintetizadas e rearranjadas de maneira mais organizadas, seguindo o tecido conjuntivo normal adjacente, o que confere a cicatriz uma configuração mais regular (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Ademais, o novo colágeno depositado passa por uma modificação estrutural em que apresenta fibras maiores, com maior número de fibrilas e com quantidades significativas de ligações cruzadas entre elas, denominando-se de colágeno tipo I, mais organizado, maduro e com mais força tênsil adquirida pela cicatriz (DEHKORDI et al., 2019).

Após a reorganização do colágeno no local neoepitelial, observa-se a diminuição de todos os elementos celulares e de componentes do tecido conjuntivo, o que resulta na redução de sua síntese. Por fim, também se observa que há uma decréscimo da vascularização e os vasos neoformados sofrem apoptose, fenômeno denominado de regressão endotelial, importante para eliminar células supérfluas, conseqüentemente, forma-se a cicatriz (IBRAHIM et al., 2018).

Dessa forma, a cicatrização deve ser acompanhada por meio de uma avaliação subjetiva e objetiva. Na primeira, o avaliador analisa macroscopicamente o curso do reparo tecidual e realiza o acompanhamento clínico que será considerado satisfatório quando ocorrer o pleno fechamento lesão (MARTELLI et al., 2016).

Na avaliação objetiva, são utilizadas diversas técnicas que podem mensurar a evolução do reparo tecidual de maneira mais precisa, como a: planimetria digital, a tensiometria, a microscopia, a histomorfometria, a imunohistoquímica, entre outras. Esses métodos bem como a combinação entre eles são essenciais para tornar o acompanhamento da cicatrização mais completo e preciso (SANTOS et al., 2020).

### 3.3 DIABETES NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

As feridas são eventos que afetam além da fisiologia da pele, também a qualidade de vida de quem as tem e também lhes causam um alto impacto socioeconômico (OLIVEIRA et al., 2019). Nesse sentido, busca-se um tratamento que vise a sua cura, por isso, o processo de cicatrização das feridas pode ser dividido em três fases: inflamatória ou exsudativa, proliferativa e remodelação

(PRADO et al., 2020). Salienta-se, também, que é complexo o processo de cicatrização, pois, sofre interferência de diversos fatores, tais como: idade, estado nutricional e presença de DCNT; e de fatores locais (infecção e presença de tecido necrótico) que podem prolongar o processo de restauração da ferida (BORGES, 2008, apud OLIVEIRA et al., 2019).

De modo específico, o processo proliferativo é dividido em três subfases (reepitelização, fibroplasia e angiogênese). Ele é o responsável pela restauração tecidual. Na primeira subfase, tem-se a formação do coágulo de fibrina e migração de leucócitos fagocitários que removerão as substâncias estranhas e microrganismos (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

A segunda subfase da proliferação, segundo os autores supracitados:

Inclui a fibroplasia e formação da matriz, que é importante na formação do tecido de granulação (coleção de elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como a fibronectina, as glicosaminoglicanas e o colágeno). A formação do tecido de granulação depende do fibroblasto, célula crítica na formação da matriz (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

O fibroblasto, não é apenas um produtor de colágeno, ele também produz elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, que são responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (ISAAC, et al. 2010; BRYANT; NIX 2013; MARTELLI et al., 2016). No processo de cicatrização, há a migração dos fibroblastos dos tecidos vizinhos para a ferida; todavia, para que isso aconteça, essas células precisam ser ativadas (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Nessa fase de proliferação e ativação dos fibroblastos, temos o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) como sendo o mais importante (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). Por conseguinte, tem-se a liberação do TGF- $\beta$  que ativa os fibroblastos a realizarem colágeno tipo I e a propiciar a redução da lesão. (ISAAC, et al. 2010; BRYANT; NIX 2013; MARTELLI et al., 2016).

A última fase da proliferação é a angiogênese, essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização, no entanto, em pessoas com diabetes há a diminuição da síntese de colágeno e da angiogênese. Nessa etapa, há a geração de vasos sanguíneos novos e é sistematizada por meio de fatores de crescimento (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , VEGF, FGF, PDGF), macrófagos e células endoteliais danificadas. A fase de retração da ferida consiste na diminuição do seu tamanho total e no reforço

da resistência da cicatriz (ISAAC, et al. 2010; BRYANT; NIX 2013; MARTELLI et al., 2016).

De acordo com a lesão ela pode apresentar contração mesmo quando há enxertos, que reduzem em 20% o tamanho da ferida, sendo estimulada pelos miofibroblastos e pela reestruturação do colágeno. A última fase do processo se dá na remodelação do tecido, trata-se da fase mais longa da cicatrização e pode se prolongar por meses. Ao se depositar na matriz extracelular o colágeno reorganiza esta matriz ampliando a força de tensão do tecido e reduzindo o tamanho da cicatriz e do eritema (ISAAC, et al. 2010; BRYANT; NIX 2013; MARTELLI et al., 2016).

A nova cicatriz gerada poderá ocasionar perda da função do tecido ou não, sendo este um parâmetro para analisar o sucesso de um tratamento. Caso haja a redução da neovasculatura, esta cicatriz poderá ser classificada avascular. Uma cicatrização dentro dos padrões de normalidade apresenta cerca de 80% resistência da tensão da pele saudável, plana e não volumosa (ISAAC, et al. 2010; BRYANT; NIX 2013).

O sucesso da cicatrização normal perpassa por uma sequência de ocorrências complexas, coordenadas que compreende a migração celular, inflamação, propagação de variados tipos celulares, angiogênese, geração de componentes da matriz extracelular (MEC), reestruturação e reepitelização. No diabetes mellitus inúmeros fatores influenciam no metabolismo deste processo, o que torna o tratamento mais lento e sujeito a complicações. (MARTELLI; ANDRADE; SANTOS, 2018).

A adversidade cicatricial está associada à demora no início do reflexo inflamatório e seu prolongamento por maior tempo, visto que a função fagocitária dos macrófagos está comprometida. Além disso, a redução da angiogênese, modificação na reprodução de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, ampliação da apoptose destas células, redução da migração de fibroblastos, falhas na deposição de colágeno e atenuação da produção de fatores de crescimento também afetam a cicatrização (POLACHINI et al., 2019).

Além das modificações relacionadas com as etapas da cicatrização, a hiperglicemia crônica propicia modificações nas células do endotélio vascular gerando uma enfermidade chamada de microangiopatia diabética. A redução do fluxo sanguíneo, provocada pelos danos endoteliais, reduz a oxigenação e nutrição

dos tecidos, atrapalhando o sistema de cicatrização de modo geral, além de estar ligada a lesões isquêmicas (GOIS et al., 2019).

A microangiopatia diabética está ligada com a neuropatia diabética, outra desordem do diabetes que atrapalha a cicatrização. A redução do fluxo sanguíneo dos capilares perineurais causa esfacelos isquêmicos em torno do epineuro e do perineuro. Associadas às alterações metabólicas, essas lesões causam a redução da condução de estímulos sensitivos e motores nos nervos periféricos. Com percepção dolorosa e reflexo protetor reduzidos, os enfermos com diabetes estão expostos a lesões e traumatismos que acontecem sem que os doentes notem. (SILVA et al., 2020).

Em humanos, estas lesões acontecem de modo predominante na região dos pés e são suscetíveis a infecções e traumatismos recorrentes, visto que o paciente dificilmente percebe a lesão. O atraso na identificação da ferida e conseqüentemente procurar pelo tratamento adequado complica a cicatrização intensificando o quadro inflamatório, sendo responsável pelo excessivo número de amputações (MATOS, 2017).

A hiperglicemia é uma das grandes responsáveis pela patogênese das complicações oriundas do diabetes descompensado. Pacientes que tem dificuldade de controlar os níveis séricos de glicose estão mais predispostos a complicações, sobretudo em órgãos cujas células não precisam da insulina para absorverem a glicose, tais como o sistema nervoso, coração, rins e capilares sanguíneos, resultando em grande concentração de açúcar no meio intracelular (DA COSTA SILVA, et al., 2020).

A elevação da glicose causa reações químicas, ativação e alteração do metabolismo que danificam as células e seus componentes. Admite-se que a hiperglicemia atue em várias vias metabólicas principais, estando envolvidas nas complicações pertinentes à cicatrização: a glicação proteica, a via do poliol e a via da proteína quinase (POLACHINI et al., 2019).

### 3.4 CUSTOS DO TRATAMENTO DE FERIDAS

É fundamental que haja uma avaliação de custos para que seja garantida a qualidade da assistência ao paciente. Todavia, muitos profissionais da área da saúde que lidam com esse atendimento desconhecem o custo de procedimentos bem como o tempo para a sua realização. Assim, sobretudo na área de serviços de

saúde pública, a efetividade é mensurada à medida em que os resultados de uma ação coadunam para o alcance de benefícios para a população visada, e é mais globalizante que a eficácia, a proporção em que esta indica o atingimento do objetivo. (CASTRO et al., 2007).

No SUS, tem-se o Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimento (SIGTAP) que “é uma ferramenta de gerenciamento que permite acessar a tabela de procedimentos do SUS e acompanhar as alterações realizadas em cada recurso, detalhando as características, compatibilidade e relação dos procedimentos”(SAUDI, [20-]). Em relação ao valor pago pelo curativo, o reembolso é repassado para o tratamento de feridas em curativos grau I e curativo grau II, conforme discriminação abaixo (DATASUS, 2015):

Curativo grau I - com ou sem desbridamento:

Tratamento de lesão aberta, caracterizada por pequena área de tecido afetado nos aspectos de extensão, profundidade e exsudato (grau i), com a finalidade de promover cicatrização, evitar contaminação e/ou tratar infecção. Realizado em serviços de saúde e no ambiente domiciliar (BRASIL, 2020).

Curativo grau II:

Tratamento de lesão aberta, em que há grande área de tecido afetado nos aspectos de extensão, profundidade e exsudato (grau ii), com a finalidade de promover cicatrização, evitar contaminação e/ou tratar infecção. Necessitando de cuidados mais complexos (BRASIL, 2020).

Com o aumento de preços, as tecnologias podem dificultar o financiamento do atendimento pelas instituições de saúde, sendo necessário planejamento para evitar infecções, cronificação de doenças e aumento dos custos no tratamento de feridas. Visando comparar os gastos do SUS com os custos resultantes da realização dos procedimentos com tratamentos. Para Rezende, et al, (2008) em seu estudo em vários hospitais de Sergipe, pode perceber que o custo relativo à hospitalização de pacientes com Diabetes Mellitus apresentou variação financeira de R\$ 943,72 a R\$ 16.378,85, com média de R\$ 4.461,04.(REZENDE et al., 2008).

Estudo realizado em um hospital de Santa Catarina demonstrou que o tratamento do pé diabético teve um alto custo resultando em amputações na maioria dos casos. Também evidenciou que o custo médio foi de R\$ 4.367,05 ( $\pm$  9.249,01) e o total de R\$ 192.150,40 para o tratamento de paciente diabético que precisou de amputações. Esse dado reforça a necessidade de ações voltadas para a prevenção

de lesões associadas ao pé diabético, visando impedir amputações e economizar recursos (OLIVEIRA et al., 2014a).

Em relação aos custos com curativos em pacientes com úlceras vasculogênicas, uma pesquisa realizada no Rio de Janeiro evidenciou que o valor repassado pelo SUS era notadamente defasado. No caso dos curativos limpos, o SUS o repasse foi de 19,4% do valor real total do curativo. Para os curativos infectados, o repasse correspondeu a 71,15% do total, ficando a instituição de saúde que realiza este procedimento responsável por assumir a diferença do custo real de cada tipo do curativo (MATA; PORTO; FIRMINO, 2010).

Os valores podem variar de acordo com os materiais e insumos escolhidos, bem como a profundidade e a largura da lesão, e quando são utilizadas coberturas com prata os custos são mais elevados. Estudo realizado em Minas Gerais, os Referencial Temático Metodológico 48 curativos em que foi usada a cobertura primária de prata nanocristalina, apresentaram custo mínimo de R\$ 192,64 e máximo de R\$ 260, 18 reais (ANDRADE et al., 2016). Esses dados ratificam as dificuldades dos pacientes inerentes ao seu tratamento e reabilitação em virtude do subfinanciamento e a obstaculização de acesso ao SUS, em particular, de pessoas com lesões crônicas como úlceras vasculogênicas e complicações da Diabetes Mellitus atendidas em ambulatórios e serviços públicos (BEZERRA et al., 2013).

Os gastos em saúde crescem no Brasil em ritmo acelerado, decorrente de problemas estruturais do sistema e da transição demográfica, com o envelhecimento da população, aumento da longevidade e o surgimento de doenças crônico-degenerativas (MATA; PORTO; FIRMINO, 2010).

Entretanto, os dados mostram que o subfinanciamento do SUS é um dos entraves no acesso igualitário e de qualidade de paciente em algumas instituições, fato que contribui para a coexistência com serviços sucateados, funcionários desestimulados, com má remuneração e sem um programa de educação permanente, que pode ser justificado por problemas relativos à ingerência (ANDRADE et al., 2016).

De alguma forma, é necessário que as instituições desenvolvam pesquisas relacionadas aos custos dos procedimentos realizados, com vistas a angariar maiores repasses do SUS, bem como trabalhar a conscientização dos funcionários no que tange a importância de racionalizar os recursos materiais, evitando desperdícios que acarretem custos maiores (BAPTISTA; CATILHO, 2006).

### 3.5 USO DE BIOMATERIAIS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

No processo de cicatrização de feridas de pessoas com diabetes mellitus, é mais lenta a obtenção dos resultados devido a vários fatores que interferem no metabolismo, o que o torna lento e sujeito a complicações (CANO SANCHEZ et al., 2018).

O atraso no início da reação inflamatória reflete na lentidão do reparo tecidual. Também vale destacar que a redução da angiogênese, bem como a modificação na difusão de queratinócitos, dos fibroblastos e células endoteliais, aumento da apoptose destas células, diminuição da migração de fibroblastos, defeitos na deposição de colágeno também prejudicam o processo cicatricial (XU et al., 2018; DU; LIU, 2017).

Além dessas alterações, outros fatores interferem na reepitelização tecidual, como, por exemplo: a hiperglicemia crônica por promover alterações nas células do endotélio vascular, o que resulta na microangiopatia diabética. Outro fator a ser considerado é a diminuição do fluxo sanguíneo, causada pelos danos endoteliais, reduz a oxigenação e nutrição dos tecidos, o que interfere no processo cicatricial como um todo, além de estar associada a lesões isquêmicas (YAMMINE; HAYEK; ASSI, 2020).

Outrossim, a microangiopatia diabética também está relacionada com a neuropatia diabética, visto que esta afeta os nervos periféricos, seja dos pés ou mãos. Dessa maneira, essa se caracteriza como sendo outra complicação do DM que interfere na cicatrização.

Destarte, algumas pesquisas atribuem avanços no campo da cicatricial baseados no equilíbrio entre a síntese e o fracionamento do colágeno e que é possível haver uma cicatrização mais efetiva através da introdução de aceleradores da cicatrização no local da sutura (CANO SANCHEZ et al., 2018).

Para que a ferida cicatrize a contento, é necessária a compreensão dos possíveis efeitos de métodos terapêuticos, bem como o conhecimento dos mecanismos envolvidos na sua cicatrização, pois, esse processo requer a participação de várias linhagens celulares, podendo cada uma dessas células se comportar de modo diferente com base na terapia utilizada (XU et al., 2018).

A preparação de um curativo anti-infeccioso é uma abordagem atraente para o tratamento de ferimentos e feridas cutâneas. Estudos relatam vários curativos para

feridas, que incluem alginato, policaprolactona (PCL), colagenase e quitosana em formas de filmes, fibras, andaimos e espumas (KIM et al., 2017; TORNELLO et al., 2018).

Neste contexto, o PCL como polímeros sintéticos alcançou enorme consideração devido a suas atraentes propriedades mecânicas e histocompatibilidade [DIPPOLD et al., 2019; KARUPPUSWAMY et al., 2015]. Entretanto, assim como para outros poliésteres alifáticos, o comportamento de hidrofobicidade do PCL limita suas aplicações para curativos de feridas (DING et al., 2014).

Para superar esta questão, a mistura de polímeros sintéticos e polímeros naturais pode levar às propriedades sinérgicas, que podem não ser apresentadas por polímeros individuais. Por exemplo, o PCL quando misturado com metacrilonil gelatina (GelMA) para melhorar as propriedades hidrofílicas, a compatibilidade biológica e a integridade mecânica (WANG et al., 2019).

Dessa forma é evidente que para as aplicações de curativos antimicrobianos em feridas é crucial assegurar que as feridas estejam livres de infecção bacteriana. Para fabricar o curativo de feridas, a técnica de fiação elétrica tem sido ilustrada como eficaz para criar fibras contínuas de polimercurio em uma escala de diâmetro que varia de micro a nano-escala com uma alta relação superfície/volume para melhorar as propriedades (MENG et al., 2010).

Estudos evidenciam o uso de biomateriais como uma alternativa para auxiliar no processo de cicatrização. A GelMA é um biomaterial que se assemelha aos componentes naturais da matriz extracelular em tecidos nativos e apresenta várias propriedades de significado biológico como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa antigenicidade e adesão celular (DE PAULA et al., 2018).

O desenvolvimento de mantas baseadas em polímeros capazes de melhorar a regeneração de tecidos ou órgãos através de um adequado processo de adesão celular e proliferação, é uma área de pesquisa rapidamente emergente e a eletrofiação foi uma das técnicas mais exploradas para a preparação desses arcabouços (COIMBRA et al., 2017; GIL-CASTELL et al., 2017).

Na engenharia de tecido (ET) tem se destacado a técnica de Eletrofiação Coaxial que permite a produção de fibras ultrafinas e/ou nanométricas com estrutura núcleo-casca (inglês, "core-shell") com boas características de flexibilidade,

durabilidade, biocompatibilidade e não antigenicidade quando em contato com o tecido do hospedeiro ferido (COIMBRA et al., 2017).

Essas nanofibras podem ser utilizadas como uma matriz artificial que atuam como substituto dérmico ideal, ajudando na proliferação de células, por exemplo, os fibroblastos que promovem a formação de novos tecidos (ZHAO et al., 2017). Outra vantagem do uso de fibras coaxiais é a capacidade de combinar um núcleo com propriedades mecânicas apropriadas e taxa de degradabilidade com um invólucro preparado a partir de um material altamente biocompatível que será responsável pelas interações materiais / hospedeiro (COIMBRA et al., 2017).

Um polímero bastante utilizado como núcleo na eletrofiação coaxial devido sua boa propriedade mecânica temos a Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) de formula  $(C_6H_{10}O_2)_n$ , (PCL) ou simplesmente policaprolactona é um biomaterial polimérico sintético linear aprovado pela FDA para diferentes aplicações médicas com boas características de degradação, biocompatibilidade, não tóxico, alta resistência mecânica, excelente eletrofiação e são comumente utilizado como veículo controlado de liberação de fármacos e arcabouços (ASGHARI et al., 2017; KOUSHKI et al., 2016; PRADO-PRONE et al., 2017; QIAN et al., 2014).

Uma nova abordagem tem surgido recentemente, que é o material 4D. O conceito de um material 4D parte do seguinte pressuposto, que são materiais construídos através da impressão em 3D nos quais esses materiais biocompatíveis são sensíveis, com capacidade de remodelar ou alterar sua função de acordo com estímulos externos, incluindo temperatura, água, campo magnético, e luz (GAO et al., 2016; MANDON; BLUM; MARQUETTE, 2017).

Mandon e colaboradores (2017) sugere a ampliação desta definição para não restringir a impressão 4D à capacidade de programar materiais físicos e biológicos para mudar de forma, mas também para definir a impressão 4D como a adição de novas capacidades a ferramentas impressas em 3D multi-materiais: seja física, propriedades eletrônicas, químicas, biológicas ou bioquímicas. Como já foi descrito que o PC tem capacidade de geração de oxigênio e resposta a luz visível, elemento importantíssimo na cicatrização da UDP, confere, portanto, uma quarta dimensão a manta biodegradável geradora de oxigênio impressa por eletrofiação coaxial.

Uma outra viabilidade de quarta dimensão é a resposta dessas mantas a irradiação na faixa do comprimento de onda no visível e/ou no infravermelho, para liberação controlada de oxigênio, associando assim a terapia fotodinâmica (TF)

neste projeto. Na TF, um fotossensibilizador ou precursor metabólico com capacidade de absorver um comprimento de onda específico é usado no tecido alvo antes de emitir um feixe de laser com o mesmo comprimento de onda. Assim, o precursor metabólico usa essa energia, incluindo as reações excitadas envolvidas na cura de uma ferida no site desejado (DEYHIMI e al., 2016; TEDESCO; JESUS, 2017).

#### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa em questão se trata de um estudo quantitativo e qualitativo experimental, onde neste foram produzidos scaffolds à base de policaprolactona modificada com gelatina metacrilatada para regeneração tecidual de pele de pé diabético.

##### CENÁRIO DO ESTUDO

A síntese dos scaffolds contendo GELMA E PCL-MA usados no estudo se deu por meio da técnica de eletrofiliação, no qual ocorreu nos Estados Unidos, na Harvard Medical School. Os ensaios *in vivo* como a indução da diabetes, aplicação dos materiais, análises bioquímicas nos animais realizados no Centro Universitário UNINOVAFAPI, no laboratório de pesquisas multidisciplinares atendendo aos critérios estabelecidos por meio da Lei nº. 11.794 de 08 de outubro de 2008, orientada respeito de procedimentos para o uso científico de animais, o Decreto nº. 6.899 de 15 de julho de 2009 e às normas preconizadas pelo Conselho Nacional.

##### REAGENTES

Os materiais produtos químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA): Gelatina (Tipo A, de pele suína), PCL (Mn 80.000), MA (anidrido metacrílico), metacrilato de 3-(trimetoxisilil) propilo, Irgacure 2959 (2-hidroxi-1-[4-(hidroxietoxi) fenil]-2-metil-1-propanona), estreptozocina. HFIP (Hexafluoroisopropano-2-ol) foi comprado da Oakwood Chemical

##### 4.1 SÍNTESE DO GELMA

O Gelma usado no presente estudo foi feito a partir da quantidade de 10 g de gelatina tipo A de pele porcina foi dissolvido em PBS (100 mL) a 50°C. A mistura foi agitada vigorosamente até que uma solução homogênea fosse obtida (~ 1 h). Posteriormente, 3 mL de anidrido de metacrilato foi adicionado gota a gota ao recipiente de reação e a mistura resultante foi mantida sob agitação durante 3 h a

50°C. Depois disso, a mistura foi diluída com PBS pré-aquecido (50°C) e agitada por 10 min na temperatura indicada. Em seguida, a mistura foi dialisada contra água deionizada (DI) usando tubo de diálise (12-14 kDa MWCO, Spectrum Lab Inc.) por 7 dias a 40°C. Durante o tempo, a água foi trocada pelo menos uma vez por dia. Após a diálise, a solução clara resultante foi liofilizada, proporcionando GelMA como um sólido branco (Rendimento de ~ 71%).

#### 4.2 PROCEDIMENTO PARA A PREPARAÇÃO DE FIBRAS ELETROFIADAS DE PCL

As fibras foram preparadas por eletrofiação de uma solução (10 mL) do respectivo polímero ou mistura de polímeros em solvente HFIP. Foram utilizados 4 grupos, sendo: G10% obtidos por solução a 10% de GelMA, P12% solução a 12% de PCL, PCM solução de PCL a 12% seguida de reticulação em 3-(Trimetoxissilil) propil metacrilato, PGel solução de PCL modificado e GelMA a 10%. Primeiramente, os frascos foram fechados e os polímeros foram dissolvidos sob agitação à temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente, as soluções foram colocadas em uma seringa (BD Yale, 3 mL) que foi depois aposta com agulha (Inbras, 23G). A eletrofiação foi realizada em 17 kV (Nanospinner Máquina, Inovenso) como tensão positiva. Uma placa coletora de folha de alumínio (placa quadrada de 20 cm x 20 cm) foi selecionado como o ânodo, uma distância agulha-coletor de 10 cm foi usada, e uma taxa de fluxo de solução de 1 mL / h foi aplicado (Harvard, PHD 2000). A temperatura e a umidade foram controladas em 21-23 ° C e 44-54%, respectivamente.

#### 4.3 PROCEDIMENTO PARA A PREPARAÇÃO DE PCLMA

As fibras PCL eletrofiadas foram tratadas com plasma (100 W) por 5 min, em seguida imersas em 3-(Trimetoxissilil) propil metacrilato em recipiente de vidro por 24 h em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi lavado várias vezes com água e centrifugado para remover o silano não reagido e posteriormente seco sob vácuo, resultando em PCL metacrilado de silano (PCLMA).

#### 4.4 ELETROFIAÇÃO DO GELMA E PCL-MA

Foram preparadas duas soluções, sendo GelMA (10% em HFIP) e PCL-MA (10% em DCM) e em seguida avaliadas proporções e eletrofiadas. Os recipientes foram cobertos com papel alumínio após a adição de 0,5 % de Irgacure(fotoiniciador). As amostras preparadas foram submetidas a agitação por 5 minutos.

Em seguida, a solução foi inserida em moldes cúbicos e fotoativados por 50 segundos utilizando luz UV (365 nm).

## 4.5 ANIMAIS

### 4.5.1 Ensaio in vivo

A execução de todas as etapas do projeto foi realizada somente após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário UNINOVAFAPI. Protocolo nº 008/V2/2018, anexo.

Os animais utilizados foram 50 ratos adultos, *rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, pesando entre 250-300g, onde foram alojadas em gaiolas coletivas, contendo no máximo cinco ratos por gaiola, acomodadas no biotério do Centro Universitário UNINOVAFAPI. As condições que os animais foram mantidos eram ideais, como temperatura ambiente de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  em fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, umidade relativa do ar, iluminação e presença de ruídos. Foram oferecidas água e ração à vontade.

### 4.5.2 Indução do diabetes experimental

Os animais passaram por um período de adaptação de sete dias, após esse período foram submetidos aos experimentos. Primeiro ocorreu a indução ao diabetes mellitus (DM), iniciando um jejum alimentar de 12h e posteriormente a aplicação injetada por via endovenosa de Streptozocin (Sigma Aldrich, EUA), na dose única de 0,1 a 0,3 mg/kg de peso corporal, em uma das veias da cauda do animal, fornecendo água ao animal. Para aplicação da droga, cada rato foi depositado em uma caixa aquecida com lâmpada elétrica, no decurso de 10 minutos, período fundamental para uma boa visualização das veias da cauda, em seguida, o animal foi colocado em uma pequena caixa individual, com exposição de sua cauda. Para inoculação da droga, foi usado agulhas de calibre 13 x 4,5 mm. após 30 min de tratamento, os animais se alimentaram normalmente. Foi feita a avaliação bioquímica de glicemia em jejum, através da metodologia de colorimetria enzimática com a finalidade de validar a indução no decurso de 7 e 14 dias, posterior a administração da droga (Osaretin et al., 2009).

### 4.5.3 Tratamento dos animais pós indução do diabetes

Foram considerados diabéticos, animais com glicemia superior a 200 mg/dL, sendo aferidas no 7<sup>a</sup> e 14<sup>a</sup> dias após a indução. Foram colhidas amostras de sangue

na veia lateral da cauda, para realização dos exames. Depois de confirmar a DM, dividiram-se os animais em cinco grupos, contendo cinco animais em cada grupo, GC (grupo controle), G10% (grupo gelma), PCL 12% (policaprolactona), PCL gelma (policaprolactona e gelma). Os grupos de animais foram divididos em dois subgrupos, conforme os tempos experimentais determinados para análise histológica da ferida (sétimo e décimo quarto dia). (Osaretin et al 2009). Foram feitos cortes com profundidade de 0,1m e 1,0cm de diâmetro e os materiais foram aplicados sobre as lesões.

#### ANÁLISE DA CONTAGEM DE FIBROBLASTOS

A contagem de fibroblastos foi realizada em lâminas coradas com o método HE, proveniente das áreas lesionadas no 7º e 14º dia, nas lâminas coradas foram contados o número de fibroblastos. Para análise foram fotografados 10 campos por lâmina na objetiva de 10. Os fibroblastos (FB) foram caracterizados por células com núcleos claros, grandes e ovóides de nucléolo evidente e cromatina fina indicando intensa transcrição de informação genética (LIMA; VALE, 2014). A contagem foi realizada por um investigador que era cego ao tratamento, com a utilização do microscópio (Microscópio Leica). As fotomicrografias foram avaliadas quantitativamente pelo software de análise de imagem ImageJ® realizando a seguinte ordem de comandos: file > open > edit > selections > specify > image > crop > plugin > analyse > cellcounter > results (CARVALHO et al., 2010).

#### 4.6 ANÁLISE DA QUANTIDADE DE COLÁGENO

A coloração de Picrosirius Red (PSR) é uma técnica simples e sensível de identificar a presença de colágeno quando estudado em associação com luz polarizada, permitindo desta forma, o reconhecimento dos tipos de colágenos (colágeno tipo I - coloração amarelo-avermelhada e colágeno tipo III - coloração verde-esbranquiçada) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018; MONTES; JUNQUEIRA, 1991).

Nesta avaliação, secções histológicas de 3 µm foram preparadas em lâminas de vidro silanizadas e desparafinadas em estufa a 60°C por 3h e três banhos de xilol (5 minutos). Após o processo de reidratação em série decrescente de álcool as lâminas foram incubadas em solução de Picrosirius (ScyTek®, Logan, UT, USA) por 30 minutos e então lavadas rapidamente em dois banhos de ácido clorídrico 5%, contracoradas com hematoxilina de Harris por 45 segundos e montadas com

Enhtellan®. Após preparo, as lâminas foram analisadas sob microscópio convencional e sob filtro de luz polarizada.

Para análise do colágeno foram fotografados 6 campos com ampliação de 200x (Microscópio Leica). As fotomicrografias foram analisadas quantitativamente utilizando o software de análise de imagem ImageJ®, após as imagens serem calibradas pelo comando Color Thershold (Image > Adjust > Color Thershold) na função RGB para as cores Vermelho (Mínimo de 71 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 69) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 92). Após a calibração as imagens foram convertidas para escala de cor de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary) e analisadas a porcentagem de área total de colágeno marcada em preto (Analyse > Analyse Particles).

#### 4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica que pode ser empregada para oportunizar dados sobre o tamanho, forma e arranjo das partículas da amostra e a associação entre elas em uma escala nanométrica. É largamente usada para capturas de "rede" na característica de hidrogéis (El FRAY et al., 2007).

As micrografias foram feitas para verificar os níveis de modificações da estrutura nanofibrilar nas amostras do hidrogel. As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram adquiridas no microscópio eletrônico. A técnica consiste no reflexo da passagem de um feixe de elétrons num ponto da superfície da amostra e a subsequência recolha dos sinais eletrônicos emitidos pelo material. As amostras foram colocadas em um suporte, porta amostras metálicas de cobre, e recobertas com uma camada de ouro.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

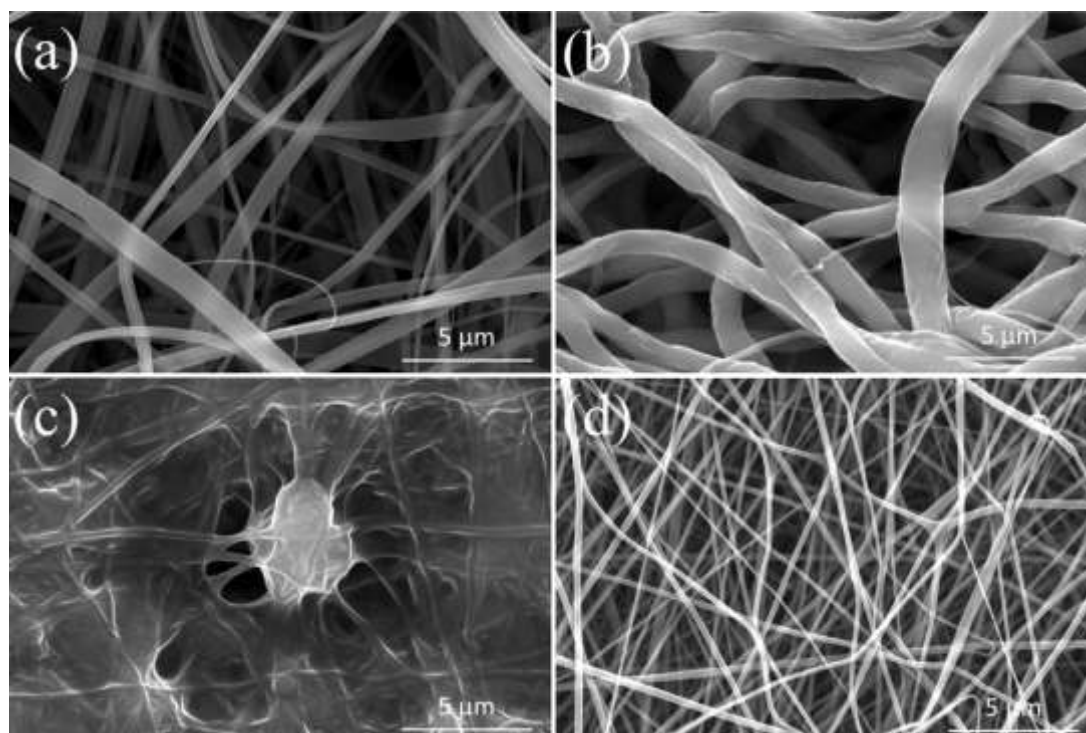
Foi realizado o teste de normalidade Shapiro Wilk e observado que os resultados obedeciam a uma distribuição normal, assim, da mesma forma quando avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) one way e pelo teste de Tukey como post hoc. Para os fatos não-paramétricos utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's (comparações múltiplas). Em todas as análises foi observado estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$ . Na análise estatística da quantidade de colágeno nos 7º e 14º dias foi utilizado o teste Two way. Todos estes testes foram realizados por meio do programa GraphPad Prism versão 5.0.

## 5 RESULTADOS

Nesta seção serão apresentados os resultados das análises dos materiais produzidos bem como dos seus efeitos decorrentes de sua aplicação in vivo.

Na figura 1: imagens (a, b, c e d) correspondem ao resultado da análise por microscopia eletrônica de varredura dos materiais testados no presente estudo, em (a) pode-se observar as fibras de PCL puro, grupo P12%, em (b) tem-se a Gelatina, grupo G10%, em (c) tem-se PCL modificado com grupos metacrilato, grupo PCM, e na imagem (d) verifica-se o material fabricado pela técnica de eletrofiação usado na pesquisa, onde podemos notar as fibras conjugadas de PCLMA e GelMA, grupo PGel.

Figura 1 - Morfologia das nanofibras eletrofiadas obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV): (a) GeIMA, (b) PCL, (c) PCLMA e (d) PCLMA:GelMA.

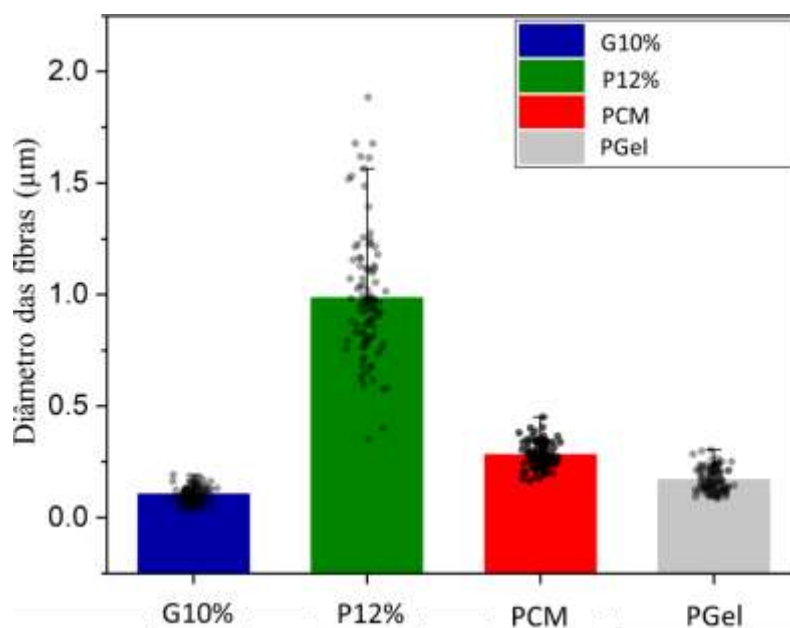


Fonte: A autora

Alguns métodos da engenharia tecidual prevê o uso de biomateriais aptos para a regeneração da pele e cicatrização de feridas, a técnica de eletrofiação tem sido usada como meio para originar biomateriais nanoestruturais que criam uma rede tridimensional sobre a lesão/ferida, imitando a estrutura fibrilar da matriz extracelular da pele. Pode-se observar na Figura 01, a formação de nanofibras fabricadas pelo processo de eletrofiação, as fibras formadas

apresentaram um aspecto linear com superfície lisa, morfologia regular, livre de grânulos e boa distribuição de fibras ultrafinas. A eletrofiação é uma técnica usualmente empregada para produzir fibras sub-micrométricas utilizando polímeros fundidos em solução. (MANCIPE; DIAS; THIRÉ, 2019)

Figura 2 – O diâmetro médio das fibras obtidas medido para todos os grupos. Os valores são expostos como média  $\pm$  SD, N = 100. ANOVA one-way ( $p < 0,05$ ) seguido por um teste de comparações múltiplas de Tukey



Fonte: Autor

O grupo PCL 12% apresentou o maior diâmetro de fibra com  $0,98 \pm 0,27 \mu\text{m}$  devido a uma rápida volatilização do HFIP (GORENINSKII, S.2021). A modificação estrutural do PCL com adição do grupo metacrilato deve modificar suas propriedades mecânicas e morfológicas. Então, o diâmetro da fibra de PCM, um PCL modificado diminui para  $0,28 \pm 0,05 \mu\text{m}$ , o que pode ocorrer devido à retração obtida pelo aumento da reticulação após a modificação (AFEWERKI, S. 2021). A membrana composta por GelMA e a mistura PCLMA:GelMA não sofreram modificação significativa, já que GelMA mede  $0,10 \pm 0,03 \mu\text{m}$  e para Pgel  $0,16 \pm 0,05 \mu\text{m}$ .

Na tabela 01, são apresentados valores referentes a média dos resultados das dosagens de glicemia dos animais tratados no presente estudo no 7º e 14º diade tratamento com G10%, P12%, PCM, PGel.

Tabela 01 - Média dos valores de glicemia dos animais tratados em 7 e 14 dias

	7 dias	14 dias

	Antes do tratamento	Depois do tratamento	Dia da eutanasia	Antes do tratamento	Depois do tratamento	Dia da eutanasia
Control (n = 4)						
Media (mg/dL)	85.75	556.25	550.5	88.33	557.33	535.00
G10% (n = 4)						
Media (mg/dL)	102.00	423.75	412.50	83.25	464.00	462.75
P12% (n = 5)						
Media (mg/dL)	87.40	473.00	513.80	83.50	464.00	457.50
PCM (n = 4)						
Media (mg/dL)	83.25	460.00	456.00	85.00	556.00	267.00
PGel (n = 4)						
Media (mg/dL)	87.50	271.50	262.50	78.00	448.60	422.00

Fonte: Autoria própria

É possível observar que o grupo controle nos primeiros sete dias a média de glicemia dos ratos antes da indução do diabetes se encontravam estável, sem alterações, onde R1= 81 mg/dL, R2= 92 mg/dL, R3=88 mg/dL, R5= 82 mg/dL, com média glicêmica de 85,75 mg/dL. Após 7 dias de indução obteve os seguintes resultados R1= 498 mg/dL, R2=541 mg/dL, R3=596 mg/dL, R5= 590 mg/dL, com média glicêmica de 556,25 mg/dL. Antes da eutanásia foi feito novamente os testes bioquímicos, no qual os resultados obtidos foram: R1= 490 mg/dL, R2= 540 mg/dL, R3=586 mg/dL, R5= 585 mg/dL. A média glicêmica inicial apresentada pelos ratos

antes da indução ao diabetes com 14 dias foi de 88,33 mg/dL (R1=83 mg/dL, R2= 95 mg/dL, R3= 87 mg/dL), após a indução essa média se alterou para 557,33 mg/dl (R1= 500 mg/dL, R2= 592 mg/dL, R3= 580 mg/dL) e no momento pré eutanásia os valores continuaram alterados, porém com pequeno declínio da glicemia, com média glicêmica de 535 mg/dL (R1= 490 mg/dL, R2= 537 mg/dL, R3= 578 mg/dL).

O grupo Gelma com sete dias que se antecedeu a data da indução do diabetes estava com a média glicêmica de 102 mg/dL (R1= 100 mg/dL, R2= 98 mg/dL, R3= 100 mg/dL, R5= 110 mg/dL). Após sete dias de indução ao diabetes obteve um média de 423,75 mg/dL (R1=388 mg/dL, R2= 429 mg/dL, R3= 498mg/dL, R5= 380 mg/dL). Essa média teve um pequeno declínio até o momento da eutanásia que foi de 412,5 mg/dL. Com 14 dias a média inicial foi de 83,25 mg/dL (R1=98mg/dL, R2 86mg/dL, R3= 79 mg/dL, R4=70 mg/dL), com 14 dias foi de 464 mg/dL (R1= 472 mg/dL, R2= 497 mg/dL, R3=587 mg/dL, R4= 300 mg/dL) e pré eutanásia ocorreu uma redução da média de 462,75 mg/dL (R1=486mg/dL, R2=490 mg/dL, R3= 578 mg/dL, R4= 297 mg/dL).

O PC 12% com sete dias antes da indução da diabetes possuía uma média de 87,4 mg/dL (R1=97mg/dL, R2= 85mg/dL, R3= 87 mg/dL, R4= 92mg/dL R5= 76mg/dL), com 7 dias após a indução esse parâmetro se elevou para uma média de 473 mg/dL (R1= H1- 600mg/dL, R2= 230 mg/dL, R3= H1, R4= H1, R5= 589 mg/dL) esse valor se elevou próximo da eutanásia com uma média de 513,8 mg/dL (R1- 586 mg/dL, R2- 228 mg/dL, R3- 587 mg/dL, R4- 588 mg/dL, R5- 580 mg/dL). A média glicêmica inicial de PC 12% apresentada pelos ratos antes da indução ao diabetes foi de 83,5 mg/dL (R1=98 mg/dL, R2= 87 mg/dL, R3= 79 mg/dL, R4=mg/dL), com 14 dias após a indução ao diabetes foi realizada uma nova dosagem bioquímica, no qual a média glicêmica foi de 464 mg/dL (R1= 472 mg/dL, R2= 497 mg/dL, R3= 587mg/dL, R4= 300 mg/dL) e pré eutanásia foi de 457,5 mg/dL (R1- 470 mg/dL, R2- 490 mg/dL, R3- 583 mg/dL, R4- 287 mg/dL).

A média inicial glicêmica do PCM, foi de 83,25 mg/dL (R1- 96 mg/dL, R2- 87 mg/dL, R3- 78 mg/dL, R4- 72 mg/dL), após sete dias de indução ao diabetes foi de 460mg/dL (R1- 470 mg/dL, R2- 490 mg/dL, R3- 580 mg/dL, R4- 300 mg/dL), já a média pré eutanásia foi de 456 mg/dL (R1- 487 mg/dL, R2- 480 mg/dL, R3- 570 mg/dL, R4- 287 mg/dL). Os ratos com 14 dias de indução, iniciou com um média de 85 mg/dL (R1- 81 mg/dL, R2- 91 mg/dL, R3- 88 mg/dL, R4- 80 mg/dL), com 14 dias de indução ao diabetes obteve-se um média de 556 mg/dL (R1- 498 mg/dL, R2- 540

mg/dL, R3- 590 mg/dL, R4- 596 mg/dL), e pré eutanásia ocorreu um grande declínio para uma média de 267 mg/dL (R1- 487 mg/dL, R2- 530 mg/dL, R3- 570 mg/dL, R4- 538 mg/dL).

O grupo PC gel iniciou com uma média de 87,5 mg/dL (R1- 106 mg/dL, R2- 87 mg/dL, R3- 88 mg/dL, R5- 69 mg/dL), após sete dias (indução ao diabetes) essa média elevou-se para 271,5 mg/dL (R1- 218 mg/dL, R2- 266 mg/dL, R3- 302 mg/dL, R5- 300 mg/dL). A última média avaliada desse grupo foi antes da eutanásia que foi de 262,5 (R1- 210 mg/dL, R2- 260 mg/dL, R3- 300 mg/dL, R5- 280 mg/dL). Os ratos com 14 dias de indução, iniciou com uma média de 78 mg/dL (R1- 78 mg/dL, R2- 76 mg/dL, R3- 80 mg/dL), após 14 dias obteve-se uma média de 448 mg/dL (R1- 478 mg/dL, R2- 468 mg/dL, R3- 400 mg/dL) e pré eutanásia a média estava de 422 mg/dL.

Na figura 03: a, b, c e d, visualiza-se os resultados dos cortes feitos na região dorsal dos animais para posterior aplicação do curativo, em “c” verifica-se os curativos implantados nas incisões realizadas nos animais e em “d” as incisões dos animais após o 14º dia da implantação dos curativos

Figura 3 - Figura ilustrativa dos cortes e do implante dos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis modelo experimental em *Rattus norvegicus*.

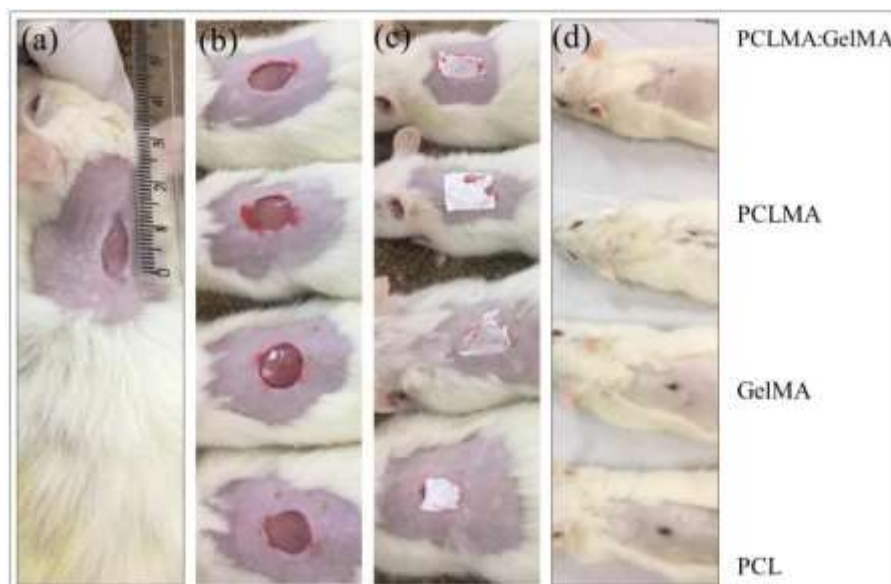


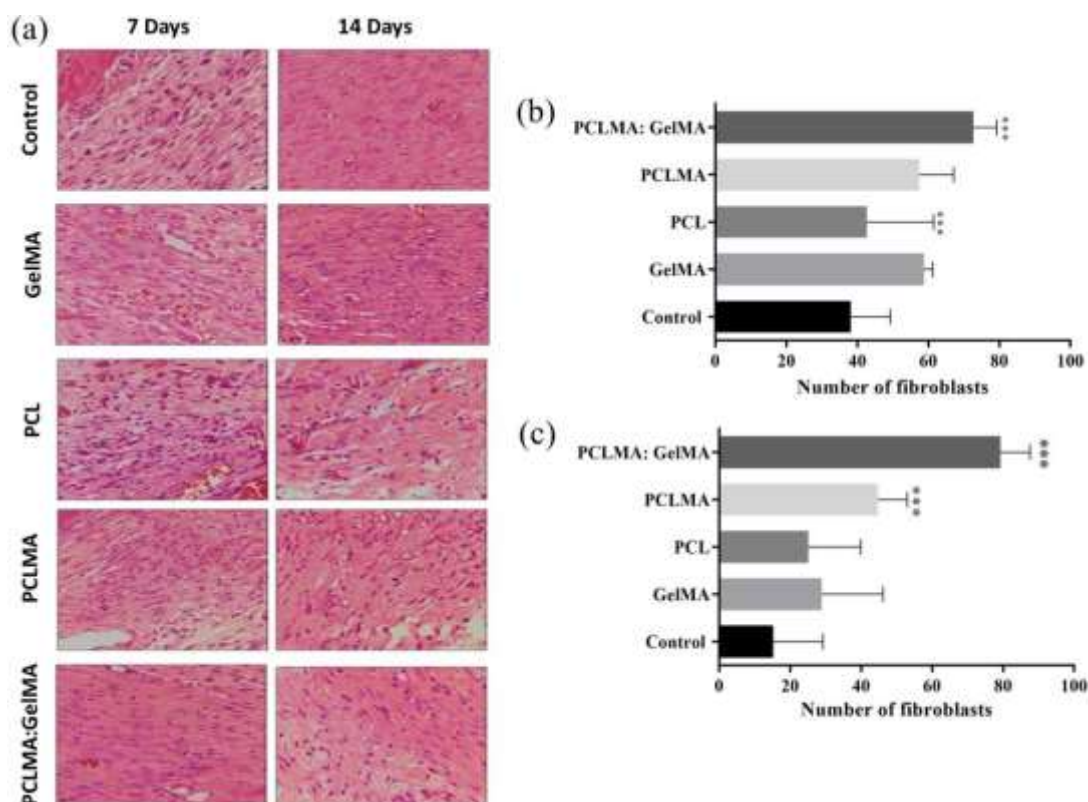
Figura 02 (a) Medida do tamanho do defeito. (b) As feridas feitas em todos os grupos. (c) Os curativos usados para o tratamento. (d) O processo de cicatrização das feridas após 7 dias. Fonte: A autora.

As incisões foram realizadas com bisturi com profundidade de 0,1mm e 1,0 cm de diâmetro (**Figura 3. a**). Em **figura 3 (c)** verifica-se os curativos base de policaprolactona modificada com gelatina metacrilatada já implantados nas incisões

realizadas nos animais, nota-se que o material teve uma boa adesão ao local aplicado, fato que favoreceu ainda mais a sua aplicação nas lesões, já na Figura 3 (D), observa-se que no local onde foram implantados os curativos usados no estudo que após o 14º dia de tratamento o material implantado foi totalmente absorvido e que ainda houve uma redução do tamanho da lesão geradas. Igualmente vê-se ainda que as lesões apresentam um bom aspecto, não apresentando sinais clínicos de infecção como exudato purulento ou edema, bem como sinais de necrose por falta de oxigenação dos tecidos.

Na figura 4 tem-se número de fibroblastos encontrados nos curativos nota-se que houve um aumento estatisticamente significativo, no número de fibroblastos encontrados nos grupos G10%, PCM e PGel quando comparado com o grupo controle [0,8(53,7,0±62,0); 3,4(39,7 ± 67,3); 2,3(63,3±79,7) vs 3,9(17,0±53,30 (Controle p=0,0003), respectivamente] (vide figura 4-A). Deste modo, houve um aumento também, no número de fibroblastos no grupo PGel quando comparado com o grupo G10% [2,3(63,3±79,7) vs 0,8(53,7,0±62,0), p=0,0022]. (vide figura 4-C).

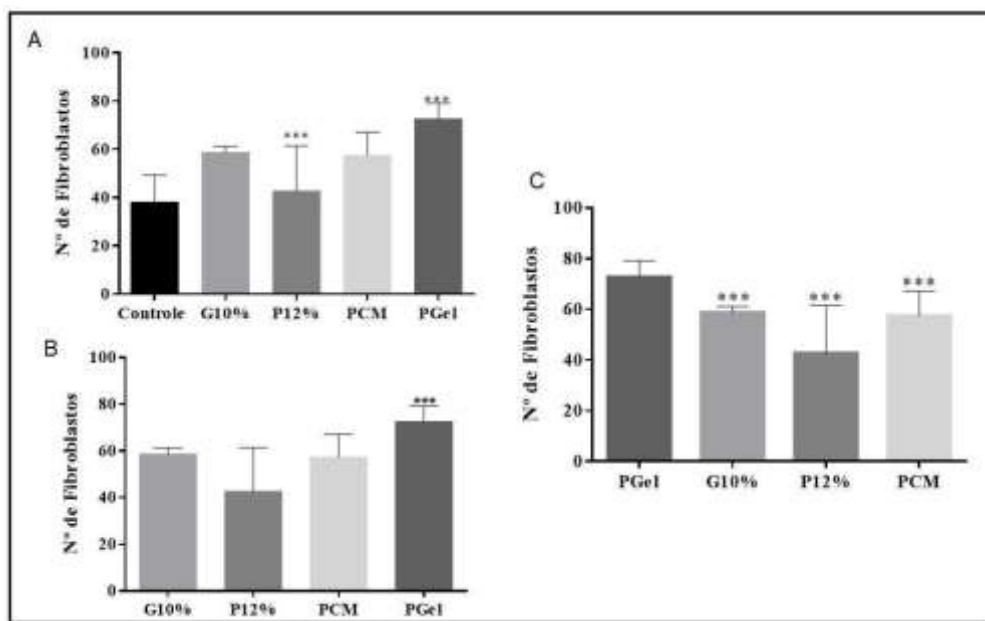
Figura 4 - Número de fibroblastos encontrados nos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis.



Assim como pode-se ver também, uma diferença significativa no número de fibroblastos encontrados nos grupos P12% e PCM quando comparado com o grupo

PGel [6,6(27,0±78,3);3,4 (39,7 ± 67,3) vs 2,3(63,3±79,7), (PGel, p=0,0007), respectivamente] (vide figura 4-B).

Figura 4 - Número de fibroblastos encontrados nos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis no 7º dia de protocolo experimental modelo de indução da diabéticos em Rattus novergicus.

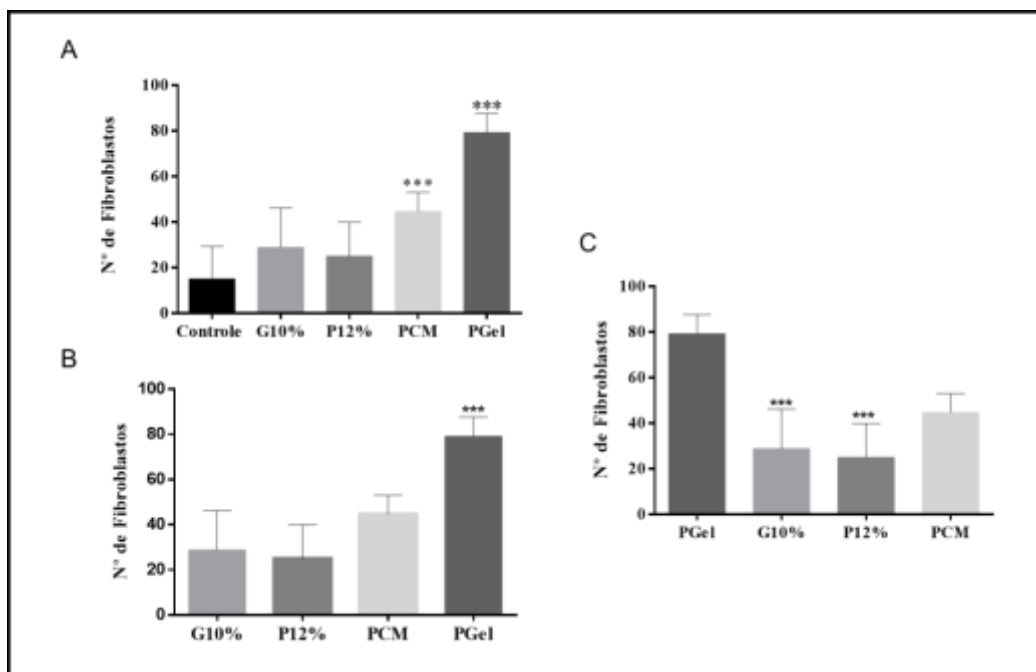


Fonte: A autora. Os dados foram representados média±EPM e foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's. Onde

\*\*\* p<0,05 vs grupo controle.

Na figura 5 observa-se o número de fibroblastos encontrados nos curativos no 14º dia de protocolo experimental, com base nos resultados apresentados pode-se atentar um aumento estatisticamente significativo apenas nos grupos PCM e Gel quando comparado com o grupo controle [3,35(31,7± 53,0); 3,43(68,7 ± 89,7) vs 5,79(5,7± 42,7) (Controle p= 0,0004), respectivamente] (vide figura 5-A). Desta forma também houve uma diferença, no número de fibroblastos encontrados nos grupos G10% e P12% quando comparado com o grupo Gel [7(10 ±49,7);6(9±44,7) vs 3,43(68,7 ± 89,7) (PGel, p=0,0022), respectivamente] (vide figura 5-B). Como também, verificou-se que houve um aumento estatisticamente significativo no número de fibroblastos encontrados no grupo PGel quando comparado ao grupo G10% [3,43(68,7 ± 89,7) vs 3,43(68,7 ± 89,7) (G10%, p= 0,0009)] (vide figura 5-C)

Figura 5 - Número de fibroblastos encontrados nos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis no 14º dia de protocolo experimental modelo de indução da diabéticos em *Rattus novergicus*



Os dados foram representados média±EPM e foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's. Onde \*\*\* p<0,05 vsb grupo PGeI

Figura 6- Porcentagem da área total de colágeno encontrados no 7º e 14º dia de protocolo experimental nos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis modelo de indução da diabéticos em *Rattus novergicus*.

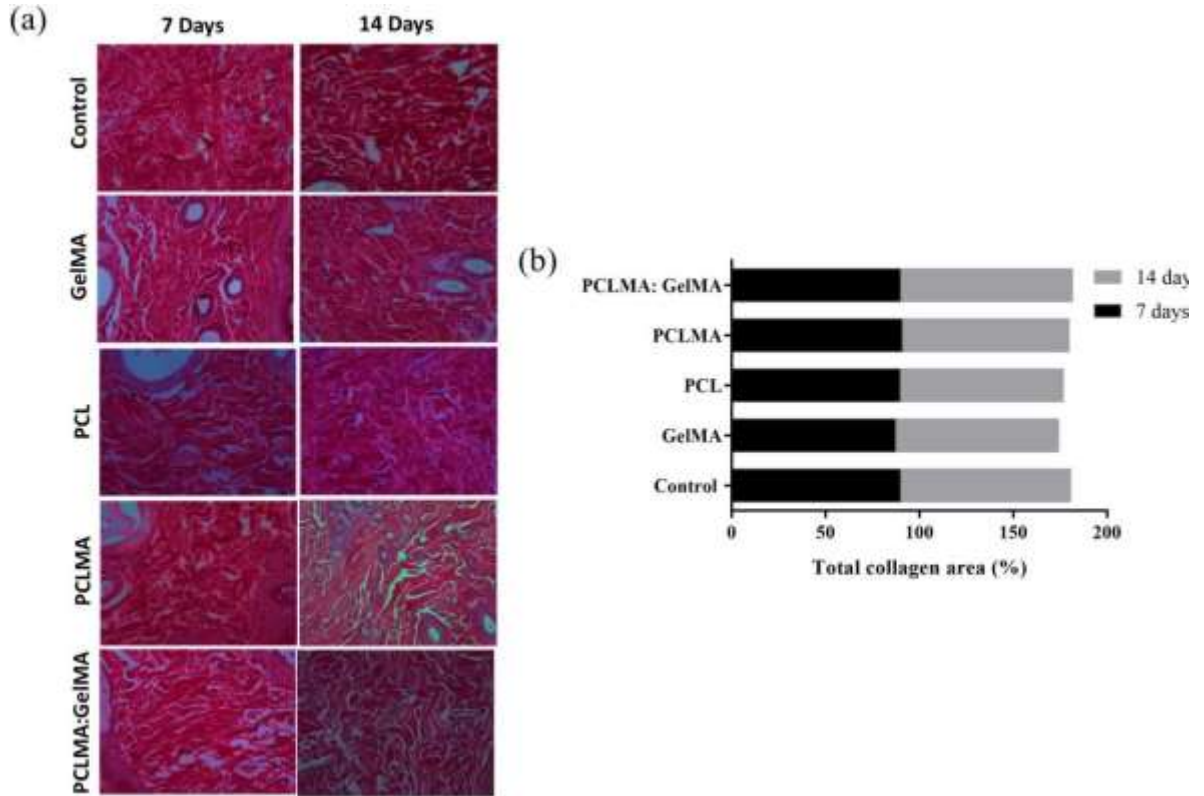
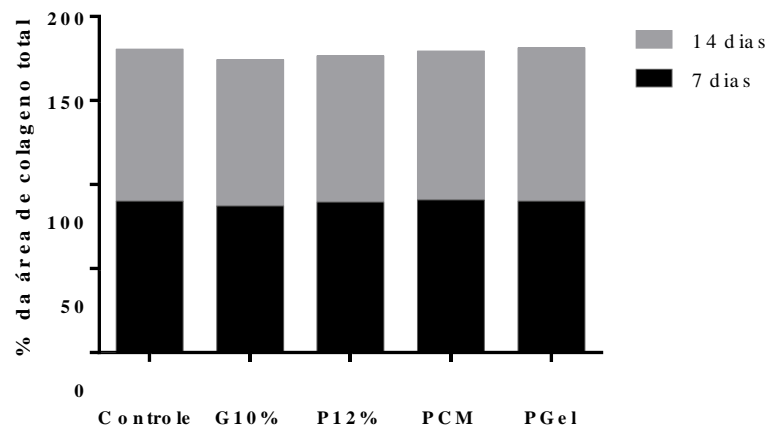


Figura 6- Porcentagem da área total de colágeno encontrados no 7º e 14º dia de protocolo experimental nos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis modelo de indução da diabéticos em *Rattus norvegicus*.

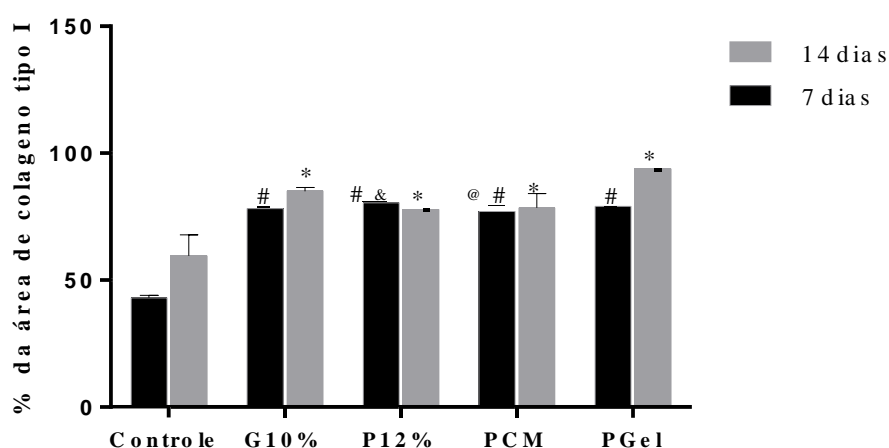


Os pontos representam a média  $\pm$  EPM do percentual de fibras de colágeno totais no 7º e 14º dia de protocolo experimental. Para análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde #  $p < 0,05$  vs grupo Controle 7 dias e \*  $p < 0,05$  vs grupo Controle 14 dias.

Assim por meio da coloração picrossirius pode-se observar que no 7º dia de protocolo experimental, ocorreu um aumento estatisticamente significativo na área

de colágeno tipo I nos grupos: G10 %, P12%, PCM e PGel quando comparado com o grupo controle [0,54(75 ±80);0,42(78 ±82);0,50(74 ±79);0,51(76 ±81) vs 1,47(40 ±56), (Controle, p=0,004), respectivamente]. Além disso quando comparamos com o grupo G10% notou-se, apenas uma diferença estatística para o grupo P12% [0,42(78 ±82) vs 0,51(76 ±81), (G10%, p=0,0066)]. Como também se observou apenas uma diferença estatística significativa no grupo PCM quando comparado com PGel [0,50(74 ±79) vs 1,47(40 ±56), (Pgel, p=0,0001)] (vide figura 6).

Figura 7 - Porcentagem da área de colágeno tipo I encontrados no 7º e 14º dia de protocolo experimental nos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis modelo de indução da diabéticos em *Rattus novergicus*.



Os pontos representam a média± EPM do percentual de fibras de colágeno tipo I no 7º e 14º dia de protocolo experimental. Para análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # p<0,05 vs grupo Controle 7 dias, \* p<0,05 vs grupo Controle 14 dias, & p<0,05 vs grupo G10% 7 dias e @p<0,05vs Pgel 7 dias.

Quanto ao 14º dia de protocolo experimental como esperado nota-se uma diminuição na área de colágeno tipo I em todos os grupos. Contudo nota-se apenas uma diferença estatística nos grupos G10% e PGel quando comparado com grupo controle [4,4(61±92);1,7(90±99) vs 1,2(47±55), (Controle, p=0,0001)]. Assim como o observado na figura 6, onde nota-se uma diferença estatística também apenas nos grupos G10% e Pgel na porcentagem de colágeno tipo III.

Figura 8 - Porcentagem da área de colágeno tipo I e III encontrados no 7º e 14º dia de protocolo experimental nos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis modelo de indução da diabéticos em *Rattus novergicus*.

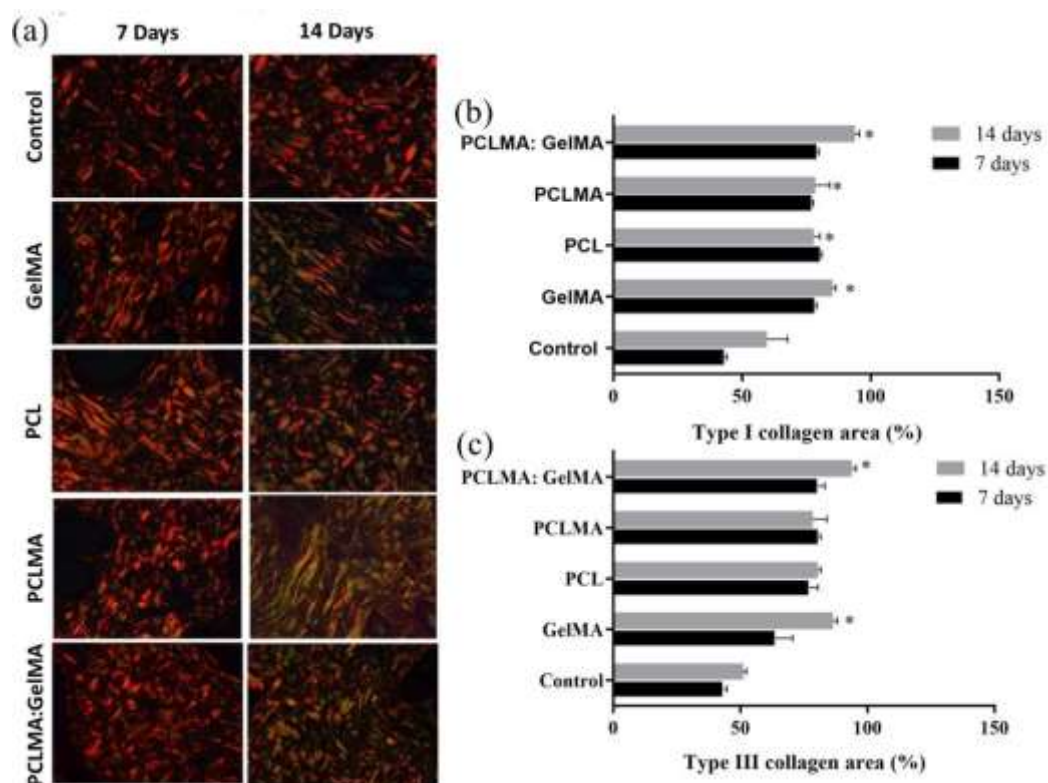
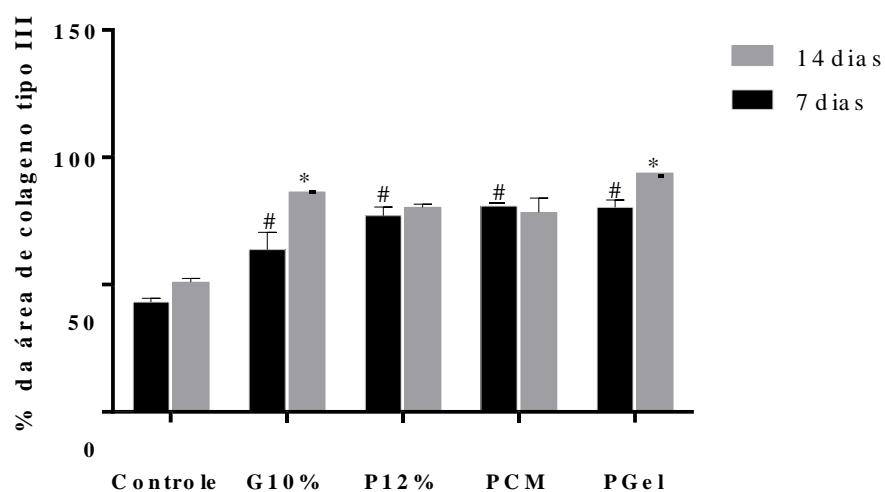


Figura 8 - Porcentagem da área de colágeno tipo III encontrados no 7º e 14º dia de protocolo experimental nos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis modelo de indução da diabéticos em *Rattus norvegicus*.



## 6 DISCUSSÃO

A MEV é um método padrão utilizado para inspeção e análise em diversas áreas, vai da engenharia de materiais a biológicas. A grande resolução dos microscópios eletrônicos modernos é em torno de 100 vezes melhor do que a resolução do microscópio óptico (BRENDON; CHRISTOFOLETTI, 2007). O método

MEV é amplamente usado para estudos de porosidade de materiais produzidos por eletrofiação, uma vez que outras técnicas como a porosimetria de mercúrio podem ser destrutivas, devido à alta pressão aplicada (RAMAKRISHNA et al., 2005). Em comparação com estudos realizados por Lobo. A. O. et al (2021) onde em estudos usando fibras de PCLMA:GelMA em análise de microscopia eletrônica de varredura pode observar fibras com superfícies lisas, homogêneas e sem defeitos, resultado este semelhante com análises de MEV feitas no presente estudo. **(Figura 01 a- d)**. Fibras obtidas por bom processo de eletrofiação devem desenvolver microambientes que imitam tecidos nativos com boas características físicas e bioquímicas alcançadas por incorporação de biomoléculas para promover melhor interação célula-scaffold (AFSHARIAN, Y.P. 2021) **(Figura 01 d)**.

Foi realizado testes bioquímicos para avaliar as condições glicêmicas dos ratos antes e depois do protocolo, durante 7 e 14 dias, para constatar que os ratos foram induzidos ao diabetes mellitus e que as incisões foram realizadas quando suas glicemias estavam alteradas. De acordo com Santos (2016), ratos que pesam entre 180-200g, com glicemia superior a 200mg/dL, são considerados diabéticos. Conforme **(Tabela 01)** todos os ratos tiveram uma glicemia inicial abaixo desse valor, dessa forma, pode -se inferir que os ratos estavam com glicemia normal, antes do início do tratamento e diabéticos no momento da implantação do material.

Segundo Soares (2015), dentre os mais variados modelos de curativos para feridas produzidos até o momento, os hidrogéis, em virtude de suas características intrínsecas, são os que melhor reproduzem a matriz extracelular e tem o potencial para conduzir a migração, adesão e crescimento celular durante a regeneração do tecido, eventos essenciais para regeneração da pele. Quando aplicado no local da lesão, os hidrogéis proporcionam uma cura úmida e resfria a superfície da lesão, o que pode diminuir a dor e promover uma melhor qualidade de vida ao paciente **(Figura 02)**.

Na **(Figura 3- D)**, após o implante de curativos é possível evidenciar o processo cicatricial sendo finalizado, com redução progressiva das lesões e reepitelização. O processo de cicatrização consiste em dois pilares fundamentais: A produção de colágeno, processo que pode ser evidenciado nas imagens contidas na **(Figura 09)**, onde nesta, o colágeno tipo I apresentando uma coloração amarela avermelhada e o colágeno tipo III apresentando coloração verde esbranquiçada e a

vascularização. A vascularização, promove a chegada das células aos sítios de inflamação, além de permitir o aporte de nutrientes e oxigênio.

De acordo com Reed et al., (1998), a formação dos vasos é modulada pelos fatores de crescimento transformador básico (TGF- $\beta$ ) e pelas proteínas da matriz, no qual o TGF- $\beta$  eleva a produção de citocinas, que induzem a angiogênese, estimulando a produção de colágeno tipo I e inibem a produção de colagenase intersticial.

Segundo Morais (2013), há uma diferença no processo de cicatrização de feridas abertas e fechadas, embora as reações após as lesões, serem parecidas para as duas, ocorrendo exsudação inflamatória, proliferação celular, migração celular, neoformação celular e epitelização a partir das margens. No presente estudo, não houve presença de exsudados após os 14<sup>o</sup> dias, nem durante a implantação do curativo a lesão. Após o 14<sup>o</sup> dia de tratamento, o material implantado foi totalmente absorvido, reduzindo o tamanho da lesão, favorecendo um bom aspecto à lesão **(Figura 03)**.

O número de fibroblastos encontrados nos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis no 7<sup>o</sup> dia de protocolo experimental em modelo de indução da diabéticos em *Rattus norvegicus*, em A, na **(Figura 05)**, pode-se observar um aumento significativo de fibroblastos encontrados em curativos a base de G10%, PCM e PGel quando comparados com o grupo controle, bem como quando comparamos os resultados de PGel e G10%, conseguimos notar significância maior no grupo PGel. O grupo controle mostrou-se com menor resultados sobre os produtos testados, isso pode ser justificado pelo resultado observado no grupo controle, que não possuía finalidade terapêutica.

Em relação ao G10%, o grupo PGel se sobrepôs, trazendo resultados mais vantajosos, o que pode ser justificado pela associação dos dois produtos para composição do PGel, a policaprolactona e o Gelma, a policaprolactona é um dos materiais sintéticos mais empregados na engenharia dos tecidos e bioaplicações médicas, em virtude de suas propriedades vantajosas, como biodegradabilidade, biocompatibilidade, alta permeabilidade, porém a sua natureza altamente hidrofóbica, impede a adesão celular favorável e sua degradação lenta ocasionalmente limita suas aplicações.

A hidrofilicidade é importante para que ocorra a infiltração de células dentro do material, bem como transporte de água e nutrientes e resíduos celulares para promoção da fixação celular, o Gelma, tem propriedades semelhantes a matriz

extracelular (MEC), em virtude da presença da ligação celular e metaloproteinase de matriz, é responsável pela proliferação celular, dessa forma a combinação desses dois compostos, trouxe resultados positivos.

A policaprolactona (PCL) é um poliéster alifático com baixa toxicidade, é largamente utilizada na engenharia tecidual e na produção de estruturas utilizadas como matriz carreadoras de substâncias ativas como fármacos (MANCIPE et al, 2019) é biocompatível e bioabsorvível, ótimas características definidas em um bom biomaterial (MARTINS et al, 2016).

Com 14 dias de protocolo experimental, foi observado que houve um aumento estatístico significativo do grupo PCM e PGel sobre o grupo controle (**Figura 6-A**), ainda foi possível observar que houve uma diferença no número de fibroblastos encontrados nos grupos G10% e P12% comparados com o grupo PGel (**Figura 6-B**), bem como relevância estatística do grupo PGel sobre o grupo G10% (**Figura 6- C**), dessa forma podemos considerar que o curativo a base de poliéster modificado com hidrogel com 14 dias de protocolo experimental, no qual foi encontrado maior número de fibroblastos foi o PGel.

Os fibroblastos são as principais células envolvidas na cicatrização e têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Atualmente a copolimerização e a combinação de polímeros sintéticos e naturais, possibilita a alteração de suas propriedades biofísicas (TALEBI et al, 2019). A junção do PCL e do gel (gelatina), pode ter desenvolvido uma maior proliferação de fibroblastos, pois o gel é derivado do colágeno e possui diversas propriedades, entre elas a de crescimento celular, juntos podem apoiar a adesão e proliferação celular.

No 7º dia de protocolo experimental sobre a porcentagem da área total de colágeno encontrados, observou-se, que houve um aumento na área de colágenotipo I nos grupos G10%, P12% e PGel em relação ao grupo controle (**Figura 05**). O colágeno tipo I possui boa capacidade de suportar a adesão e proliferação celular, isso ocorre devido sua estrutura natural, pois este é uma proteína fibrilar e possui estabilidade conformacional e abundância na matriz extracelular (CAMPOS, 2008). A gelatina é um biopolímero natural, adquirido por meio de hidrólise parcial do colágeno proveniente da pele, tendões ou ossos, o uso dessa, pode ter influenciado na reprodutibilidade dos resultados (HOQUE et al, 2014). Produtos à base de PCL, estimula a produção de colágeno, este vem sendo estudado na engenharia de

tecidos, pesquisado como base para reparo de tecidos (MOERS-CARPI et al, 2013; KIM JA, et al, 2015)

Quando os grupos foram comparados com G10% houve uma distinção estatística para o grupo P12%, com boa reprodutibilidade, bem como quando foram comparados PCM com o PGel, no qual PCM superestimou o grupo PGel. Estes resultados corroboram com os experimentos realizados no protocolo experimental anterior, do nº de fibroblastos encontrados nos curativos, no 7º dia de protocolo. Os fibroblastos são as principais células da fase proliferativa, fase anterior com avanço para fase de migração dos fibroblastos, para que estes migrem para o local da ferida necessitam ser ativados, para saírem do seu estado de quiescência (SZWED et al, 2015).

O TGF- $\beta$  atuam sobre os fibroblastos e estimula a produção de colágeno tipo I, a as transformam-se em miofibroblastos que facilitam o fechamento da ferida, dessa forma, acredita-se que tanto o P12% quanto PCM ajam entre a fase proliferativa e a fase de migração dos fibroblastos promovendo uma maior extensão de colágeno tipo I (**Figura 6**) (SZWED et al, 2015).

O colágeno do tipo I, é o tipo principal, uma vez que participa tanto da manutenção da integridade da maior parte dos tecidos em razão das suas características mecânicas, quanto também pela sua atividade na funcionalidade dos tecidos com interação entre as células presentes na MEC (RAMACHANDRAN, 1967). É considerada uma macromolécula presente em todos os vertebrados, uma das maiores e mais complexas macromoléculas no reino animal (HAY,1992).

Com relação ao colágeno III, com 14 dias de protocolo experimental, os grupos que houveram uma diferença estatística na porcentagem de colágeno tipo III foram os grupos G10% e PGel. (**Figura 7**) O primeiro colágeno a ser produzido é o colágeno tipo III, este sendo produzido na fase proliferativa, mais delgado que o colágeno presente na pele normal e justaposto a pele, este colágeno é substituído pelo colágeno I gradativamente, um colágeno mais espesso e resistente, devido a isso, há um aumento da força tênsil da ferida (SZWED et al, 2015).

Os resultados referentes a análise da expressão de colágeno tipo I e III(**Figura 6 e 7**) apontam uma diferença estatística nos grupos G10% e PGel, corroborando com estudo realizados por X. Zhao et al (2017), onde em estudos o GelMA 10%, apontou que andaimes GelMA- 10 são ideais para a cura de feridas in vivo. Na derme, o colágeno é um componente importante e desempenha um papel-

chave na resistência e elasticidade da pele (VERHAEGEN et al., 2012). As fibras colágenas representam 90% de todas as fibras dérmicas e 80% da matriz extracelular dérmica. Os colágenos tipos I, III e V são os que predominam na derme, sendo responsáveis por aproximadamente 87%, 10% e 3%, respectivamente, do colágeno dérmico. O colágeno auxilia na hidratação, resistência e elasticidade da pele (Tavakol et al, 2016)

A DM desencadeia diversos eventos metabólicos, no qual estão associados a uma elevação na produção de citocinas, estimulando o recrutamento de leucócitos, mantendo a amplificação da inflamação. Há uma hipótese de que doenças ocasionadas pela DM, proporciona uma elevação da glicosilação, esta modifica a homeostase do tecido conjuntivo, diminuindo a regeneração imunoinflamatória e contribuindo para sua degeneração. Estudos realizados em humanos e ratos diabéticos mostraram que no decurso do tempo, o colágeno torna-se menos solúvel e menos digerível pelas collagenases, pois os produtos da glicosilação modificam as características funcionais do colágeno, causando uma diminuição da remodelação do tecido conjuntivo em pacientes diabéticos (PALMA et al, 2021). Acredita-se que as substâncias testadas no presente trabalho, possam ser utilizadas no tratamento de feridas de pacientes com DM, uma vez que atuam sobre a proliferação de fibroblastos, células presentes na formação de colágeno e no processo de cicatrização.

## **7 CONCLUSÃO**

O presente estudo teve como principal intuito a produção de scaffolds a base de policaprolactona modificada com gelatina metacrilatada objetivando a regeneração tecidual de pele de pé diabético que foi investigado por meio das técnicas usadas para análise da deposição dos tipos de colágenos, avaliação histológica e outras técnicas usadas no trabalho, desta forma, foi possível concluir que:

- I- Como scaffold foram confeccionadas fibras, estas, base de policaprolactona modificada com gelatina metacrilatada, produzidas pela técnica de eletrofiação.
- II- O material produzido apresentou uma visível absorção quando aplicado. Coincidentemente é importante ressaltar a sua fácil aplicação em locais de ferimentos em virtude de sua forma de manta.
- III- O grupo que teve melhor desempenho foi PCL- modificado/GEL com base nos resultados apresentados quanto a quantidade de fibroblastos, bem como na quantidade de colágeno tipo III e tipo I, desta maneira, sugerindo um efeito benéfico na modificação deste material para aplicações voltadas a regeneração tecidual.

## **8. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTURO**

Em estudos envolvendo aplicações in vivo de biomateriais, se faz de suma importância um conhecimento aprofundado sobre os possíveis efeitos colaterais, como danos toxicogênicos, doses tóxicas das substâncias usadas para produção do material. Vale ressaltar ainda que no presente estudo se faz necessário um conhecimento maior sobre o tempo de degradação do material, bem como evidenciar caracterizações morfológicas sobre diâmetro das fibras formadas no processo de eletrofiação, e confirmação das modificações do material aplicada na metodologia.

## REFERÊNCIAS

ADEGHATE, J. et al. Novel biological therapies for the treatment of diabetic foot ulcers. **Expert opinion on biological therapy**, v. 17, n. 8, p. 979-987, 2017.

ALEMDAR, Neslihan. Fabrication of a novel bone ash-reinforced gelatin/alginate/hyaluronic acid composite film for controlled drug delivery. **Carbohydrate polymers**, v. 151, p. 1019-1026, 2016.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Executive summary: standards of medical care in diabetes-2014. 2014.

[https://care.diabetesjournals.org/content/37/Supplement\\_1/S14](https://care.diabetesjournals.org/content/37/Supplement_1/S14)

ANNABI, Nasim et al. Engineering a sprayable and elastic hydrogel adhesive with antimicrobial properties for wound healing. **Biomaterials**, v. 139, p. 229-243, 2017.

ASSMANN, Alexander et al. A highly adhesive and naturally derived sealant. **Biomaterials**, v. 140, p. 115-127, 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ESTOMATERAPIA (SOBEST). **Feridas**. São Paulo: SOBEST, 2020. Disponível em:

<https://sobest.com.br/feridas/#:~:text=O%20que%20s%C3%A3o%20feridas%3F,facilitadoras%20ou%20causadoras%20da%20ferida>. Acesso em: 18 nov. 2022.

BALBINO, Carlos Aberto; PEREIRA, Leonardo Madeira; CURI, Rui. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, jan./mar., 2005. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbcf/a/HXZMLDrTL5B7mrRRqSsbtmh/?format=pdf>. Acesso em: 18 nov. 2022.

BRASIL. Serviços e Informações do Brasil. Brasília: GOV, 2020. Disponível em:

<https://www.gov.br/pt-br/servicos-estaduais/curativo-grau-i-c-ou-s-debridamento-1>. Acesso em: 18 nov. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Diabetes (diabetes mellitus): Sintomas, Causas e Tratamentos. 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/diabetes>. Acesso em 25 Set. 2020.

CESTARI, Simara da Costa Pereira. noções de anatomia e histologia da pele. In: CESTARI, Simara da Costa Pereira. **Dermatologia pediátrica**. Atheneu. São Paulo - SP. 2012. Disponível em: [https://editoradoseditores.com.br/wp-content/uploads/2018/09/capitulo\\_02\\_dermatologia-1.pdf](https://editoradoseditores.com.br/wp-content/uploads/2018/09/capitulo_02_dermatologia-1.pdf) acesso em 18 nov 2022.

CAMCI-UNAL, Gulden et al. Synthesis and characterization of hybrid hyaluronic acid-gelatin hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 4, p. 1085-1092, 2013.

CANO SANCHEZ, Mariola et al. Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: a systematic review. **Antioxidants**, v. 7, n. 8, p. 98, 2018.

CHANG, Mayland. Restructuring of the extracellular matrix in diabetic wounds and healing: A perspective. **Pharmacological research**, v. 107, p. 243-248, 2016.

CHAVAGLIA, S. R.R et al. Caracterização de pacientes com lesão cutânea em unidades de internação médica e cirúrgica. **Revista de enfermagem UFPE**, v. 9, n. 1, p. 183-192, 2015.

COIMBRA, P. et al. Coaxial electrospun PCL/Gelatin-MA fibers as scaffolds for vascular tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 7-15, 2017.

DE CASTRO CARVALHO, K. et al. Estudo da resistência cicatricial cutânea de ratos tratados com fototerapia a laser. **Conscientiae saúde**, v. 9, n. 2, 2010.

DE OLIVEIRA LIMA, R; VALE, M. L. Resumo de Dissertação-Cicatrização da Úlcera por Pressão Experimental com Fumaça de Moxa Palito de Artemisia Vulgaris em Camundongos. **Revista Estima**, v. 12, n. 4, 2014.

DE PAULA, M. M. M. et al. Understanding the impact of crosslinked PCL/PEG/GelMA electrospun nanofibers on bactericidal activity. **PloS one**, v. 13, n. 12, 2018.

DEVALLIERE, J. et al. Co-delivery of a growth factor and a tissue-protective molecule using elastin biopolymers accelerates wound healing in diabetic mice. **Biomaterials**, v. 141, p. 149-160, 2017.

DEYHIMI, P et al. Histological evaluation of wound healing process after photodynamic therapy of rat oral mucosal ulcer. **Journal of dentistry**, v. 17, n. 1, p. 43, 2016.

DIAS, E. G. et al. Comportamento de Pacientes com Diabetes Tipo 2 sob a Perspectiva do Autocuidado. **J Health Sci**, v.19, n.2, p.109-113, 2017.

DU, J.; LIU, X. Nano Biomaterials: A promising therapeutic strategy for skin wound healing in diabetic populations?. **Pyrex J. Med. Med. Sci**, v. 4, n. 5, 2017..

GAO, Yuesheng et al. Selective flotation of scheelite from calcite: A novel reagent scheme. **International Journal of Mineral Processing**, v. 154, p. 10-15, 2016.

GIL-CASTELL, O. et al. Effect of the dissolution time into an acid hydrolytic solvent to tailor electrospun nanofibrous polycaprolactone scaffolds. **European Polymer Journal**, v. 87, p. 174-187, 2017.

GOMES, L. C.; JÚNIOR, A. J. S. Fatores favoráveis ao pé diabético em usuários de uma unidade de atenção primária à saúde. **Revista de Atenção à Saúde**, v. 16, n. 57, p. 5 -12, 2018.

GOMES, J. P. Desenvolvimento das formulações de hidrogel à base de colágeno extraído da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*). 2021. 75 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/62728>  
Acesso em 18 de nov de 2022.

GHELLERE, I. C.; BRANDÃO, B. J. F. A pele e o melasma: prevenção e tratamento na gravidez. *BWS Journal*, [S. l.], v. 3, p. 1-11, 2020. Disponível em: <https://bwsjournal.emnuvens.com.br/bwsj/article/view/72>. Acesso em: 19 nov. 2022.

GHOLIPOURMALEKABADI, M et al. Oxygen-generating biomaterials: a new, viable paradigm for tissue engineering?. **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 12, p. 1010-1021, 2016.

HASSANZADEH, P et al. Ultrastrong and flexible hybrid hydrogels based on solution self-assembly of chitin nanofibers in gelatin methacryloyl (GelMA). **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 15, p. 2539-2543, 2016.

HASSIBA, A. J. et al. Review of recent research on biomedical applications of electrospun polymer nanofibers for improved wound healing. **Nanomedicine**, v. 11, n. 6, p. 715-737, 2016.

HE, R. et al. IL-33 improves wound healing through enhanced M2 macrophage polarization in diabetic mice. *Molecular Immunology*, v. 90, p. 42-49, 2017.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **Diabetes Atlas** [Internet]. 6a ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015.

ISAAC, C et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Rev Med (São Paulo)*, v. 89, n. 3/4, jul.-dez, 2010. Disponível em: <https://fisiosale.com.br/assets/1repara%C3%A7%C3%A3o-tecidual-2708.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2022.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picro sirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.**, v.11, n.1, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica – texto/atlas**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.

LIU, Yan et al. Electrospun nanofibers as a wound dressing for treating diabetic foot ulcer. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 130-143, 2019.

KATSAROU, Anastasia et al. Type 1 diabetes mellitus. **Nature reviews Disease primers**, v. 3, n. 1, p. 1-17, 2017.

KLOTZ, Barbara J. et al. Gelatin-methacryloyl hydrogels: towards biofabrication-based tissue repair. **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 394-407, 2016.

MANDELBAUM, Samuel Henrique; DI SANTIS, Érico Pampado; MANDELBAUM, Maria Helena Sant'Ana. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **An. Bras. Dermatol.** 78 (4) • Ago 2003 • <https://doi.org/10.1590/S0365-05962003000400002>. Acesso em: 19 nov. 2022.

MALTA, D. C; SILVA, J. B. O Plano de Ações Estratégicas para o enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil e a definição das metas globais para o enfrentamento dessas doenças até 2025: uma revisão. **Epidemiol Serv Saude**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, p. 151-164, 2013.

MANDON, Céline A.; BLUM, Loïc J.; MARQUETTE, Christophe A. 3D-4D printed objects: new bioactive material opportunities. **Micromachines**, v. 8, n. 4, p. 102, 2017.

MENDONÇA, Ricardo José de; COUTINHO-NETTO, Joaquim. Aspectos celulares da cicatrização. **An. Bras. Dermatol.** v. 84, n. 3, Jul. 2009 . Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962009000300007>. Acesso em: 19 nov. 2022.

Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica**. Manual do pé diabético. Brasília, 2016.

Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Vigitel

Brasil 2013: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico Brasília: MS; 2014

Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica**. Diabetes Mellitus. Brasília, 2013. (Cadernos de Atenção Básica, n. 36).

MOKABEL, F. M. et al. The efficacy of a diabetic educational program and predictors of compliance of patients with noninsulin-dependent (type 2) diabetes mellitus in Al-Khobar, Saudi Arabia. **Journal of family & community medicine**, v. 24, n. 3, p. 164, 2017.

MONTES, G.S.; JUNQUEIRA, L.C.U. The use of the picrosirius-polarization method for the study of biopathology of collagen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.86, n.03, p. 1-11, 1991.

NUNES, F. M et al. Prevalência de lesões em órgãos-alvo em diabéticos tipo 2. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 17, n. 2, p. 85-89, 2019.

OLIVEIRA, Aline Zulte de; TORQUETTI, Camila Barbosa; DO NASCIMENTO, Laís Paula Ricardo. O tratamento da acne associado à limpeza de pele. **Revista Brasileira Interdisciplinar de Saúde**, 2020. Disponível em <https://revistarebis.rebis.com.br/index.php/rebis/article/view/110>. Acesso: 18 de nov. 2022.

OLIVEIRA, Marina Ferreira de et al. Feridas em membros inferiores em diabéticos e não diabéticos: estudo de sobrevivência. **Rev Gaúcha Enferm.** v. 40, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rgenf/a/CF4r7tFbDkNQtxWQcrpgPdK/?format=pdf&lang=pt>. Acesso: 18 de nov. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Cuidados inovadores para condições crônicas: organização e prestação de atenção de alta qualidade às doenças crônicas não transmissíveis nas Américas. Washington, DC: OPAS, 2015

PRADO-PRONE, G. et al. Photocatalytic antibacterial effect of ZnO nanoparticles into coaxial electrospun PCL fibers to prevent infections from skin injuries. In: **Energy-based Treatment of Tissue and Assessment IX**. International Society for Optics and Photonics, 2017. p. 1006608.

QIAN, X et al. Quantum spin Hall effect in two-dimensional transition metal dichalcogenides. **Science**, v. 346, n. 6215, p. 1344-1347, 2014.

QUERES, J.F. M. et al. Avaliação do Conhecimento e Atitudes e sua Relação com parâmetros de Controle do Diabetes Mellitus. **Journal of Health Connections**, v. 2, n. 1, p.1-10, 2018.

REIS, Antônia Elivanda Araújo et al. Evidências da produção científica acerca da enfermagem na promoção do autocuidado em diabetes mellitus. **Revista Interdisciplinar**, v. 10, n. 3, p. 132-140, 2018.

Rivitti, Evandro A. **Dermatologia de Sampaio e Rivitti** [recurso eletrônico]. São Paulo: Artes Médicas, 2018.

Dermatologia de Sampaio e Rivitti [recurso eletrônico] / Evandro A. Rivitti. - São Paulo: Artes Médicas, 2018.

RIZWAN, Muhammad et al. Sequentially-crosslinked bioactive hydrogels as nano-patterned substrates with customizable stiffness and degradation for corneal tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 120, p. 139-154, 2017.

RAMÓN-AZCÓN, Javier et al. Gelatin methacrylate as a promising hydrogel for 3D microscale organization and proliferation of dielectrophoretically patterned cells. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 16, p. 2959-2969, 2012.

RAMOS, R. S. P. et al. Fatores associados ao diabetes em idosos assistidos em serviço ambulatorial especializado geronto-geriátrico. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 20, n. 3, p. 363-373, 2017.

SILVEIRA, A. O. S.M et al. Complicações crônicas em diabetes, estratégias e qualidade dos serviços. **Blucher Education Proceedings**, v. 2, n. 1, p. 1-15, 2017.

SINGH, V.P. et al. Advanced glycation end products and diabetic complications. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v.18, n. 1, p.1-14, 2014.

SINGLA, Rubbel et al. In vivo diabetic wound healing potential of nanobiocomposites containing bamboo cellulose nanocrystals impregnated with silver nanoparticles. **International journal of biological macromolecules**, v. 105, p. 45-55, 2017.

SIQUEIRA, Leticia Oliveira. **A vacuoterapiano tratamento da hidrolipodistrofia ginóide**. Trabalho de Conclusão de Curso à Faculdades Magsul. 2019. Disponível em: <http://magsul-ms.com.br/biblioteca/wp-content/uploads/LETICIA-OLIVEIRA.pdf> Acesso em: 19 nov. 2022.

SISTEMA DE AUDITORIA DE CONTAS MÉDICAS (SAUDI). **Entendendo o sistema SIGTAP e a tabela de procedimentos do SUS**. Rio de Janeiro: SAUDI, [20-]. Disponível em: <https://www.saudi.com.br/blog/sistema-sigtap-tabela-procedimentos-sus/>. Acesso em: 19 nov. 2022

SOARES, L. M. de M. M. et al. Atuação fisioterapêutica na neuropatia diabética: revisão integrativa. **Revista InterScientia**, v. 7, n. 2, p. 109-130, 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2020/02/Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-2020.pdf>. Acesso em 25 Ago. 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus: **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo: SBD, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus: **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo: SBD, 2017.

THOMAZELLI, F. C. S.; MACHADO, C. B.; DOLÇAN, K. S. Análise do risco de pé diabético em um ambulatório interdisciplinar de diabetes. **Revista da AMRIGS**, v. 59, n. 1, p. 10-14, 2015.

TEDESCO, A; JESUS, P. Low level energy photodynamic therapy for skin processes and regeneration. **Photomedicine-Advances in Clinical Practice**, 2017.

VERHAEGEN, P. D. et al. Adaptation of the dermal collagen structure of human skin and scar tissue in response to stretch: an experimental study. **Wound Repair and Regeneration**, v. 20, n. 5, p. 658-666, 2012.

XU, J. et al. Experimental study of epidermal growth factor and acidic fibroblast growth factor in the treatment of diabetic foot wounds. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 15, n. 6, p. 5365-5370, 2018.

ZHAO, X. et al. Cell infiltrative hydrogel fibrous scaffolds for accelerated wound healing. **Acta biomaterialia**, v. 49, p. 66-77, 2017.

ZHANG, X. et al. Coculture of mesenchymal stem cells and endothelial cells enhances host tissue integration and epidermis maturation through AKT activation in gelatin methacryloyl hydrogel-based skin model. **Acta Biomaterialia**, v. 59, p. 317-326, 2017.

YAMMINE, Kaissar; HAYEK, Fady; ASSI, Chahine. A meta-analysis of mortality following minor amputation among patients with diabetes and/or peripheral vascular disease. **Journal of Vascular Surgery**, 2020.

OSARETIN, E.; AJULUCHUKWU, A. E.; AFOLABI, T. O.; EBUEHI, M.O.; AKINWANDE, A.I. Catalase activity, lipid peroxidation, cholesterol and triglyceride

levels in alloxan-- induced diabetes mellitus in female and male rats. **Nigerian quarterly journal of hospital medicine**, n. 19. pg 15-9, 2009.

EL FRAY, M.; PILASZKIEWICZ, A.; SWIESZKOWSKI, W. et al. Morphology assessment of chemically modified cryostructured poly (vinyl alcohol) hydrogel. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 2035-2040, 2007.

MORAES, P. R. F. S. Estudo comparativo da membrana e do Hidrogel de celulose bacteriana com colágeno em dorso de ratos. Tese de mestrado, Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, São Carlos, SP, 2013

SANTOS, T. C. C. Spray e gel a 2% de quitosana na cicatrização de feridas cutâneas em ratas diabéticas. Tese de mestrado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-Go, 2016

YUE, K.; TRUJILLO-SANTIAGO, G.; ALVAREZ, M. M.; TAMAYOL, A.; ANNABI. N.; KHADEMHOSEINI. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Revista Biomaterials*, n.73, pg. 254-271, 215.

CAMPOS, D. M. Produção e caracterização de colágeno tipo I e de compósitos hidroxiapatita-colágeno para regeneração óssea. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

TAVAKOL, S.; JALILI-FIROOZINEZHAD, S.; MASHINCHIAN, O.; MAHMOUDI, O. Bioinspired Nanotechnologies for Skin Regeneration. **Nanoscience in Dermatology**, n.26, pg. 337-352, 2016.

HOQUE, M.E., NUGE, T., YEOW, T.K., NORDIN, N. & PRASAD, R.G.S. V. Gelatin Based Scaffolds for Tissue Engineering - a Review. **Polymers Research Journal**, v.9, pg.15-32, 2014.

SZWED, D. N.; SANTOS, V. L. P. FATORES DE CRESCIMENTO ENVOLVIDOS NA CICATRIZAÇÃO DE PELE. *Cad. da Esc. de Saúde*, V.1 N.15: 7-17, 2015.

MARTINS, L. M. A et al. Tratamento da doença periodontal com a técnica de regeneração tecidual guiada por membrana de hidroxiapatita e policaprolactona. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 6, 2016.

MANCIPE, J. M. A.; DIAS, M. L. E.; MOREIRA, R. M. S. Avaliação morfológica de fibras eletrofiadas de policaprolactona em função do tipo de solvente. ,v. 24, n. 3, 2019

TALEBI, Ali et al . Proliferation and Differentiation of Mouse Spermatogonial Stem Cells on a Three-Dimensional Surface Composed of PCL/Gel Nanofibers. **Int. J. Morphol.** Temuco , v. 37, n. 3, p. 1132-1141, sept. 2019.

MOERS-CARPI M.M, SHERWOOD S. "Policaprolactona para a correção de sulcos nasolabiais: um ensaio clínico prospectivo, randomizado e controlado de 24 meses" . **Cirurgia Dermatológica** . 39 (3 Pt 1): 457-63, 2013.

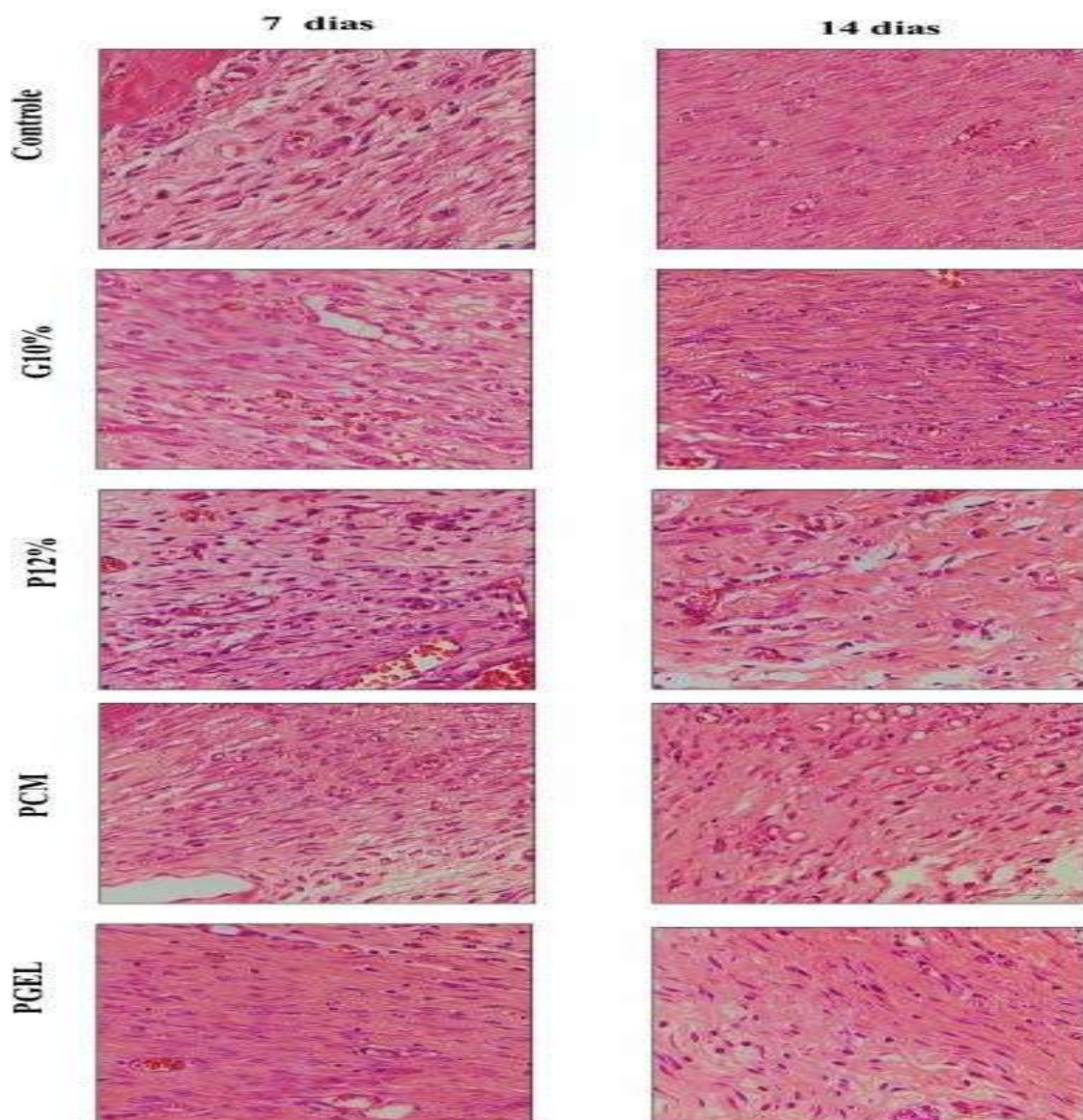
KIM JA, VAN ABEL D. "*Neocolagênese em tecido humano injetado com um preenchimento dérmico à base de policaprolactona*". *Journal of Cosmetic and Laser Therapy* . 17 (2): 99–101, 2015

PALMA PENA, S et al. Influencia de la diabetes mellitus en el tratamiento ortodÃ³ncico. RevisiÃ³n de la literatura. *Av Odontoestomatol* vol.37, n.3, pp.140-146, 2021.

GORENINSKII, S.Enhanced properties of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/polyvinylpyrrolidone electrospun scaffolds fabricated using 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol. *J. Appl. Polym. Sci.***2021**, 138, doi:10.1002/app.50535.

## APÊNDICE A – IMAGENS DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS POR COLORAÇÃO H&E NO 7º E 14º DIA DE TRATAMENTO

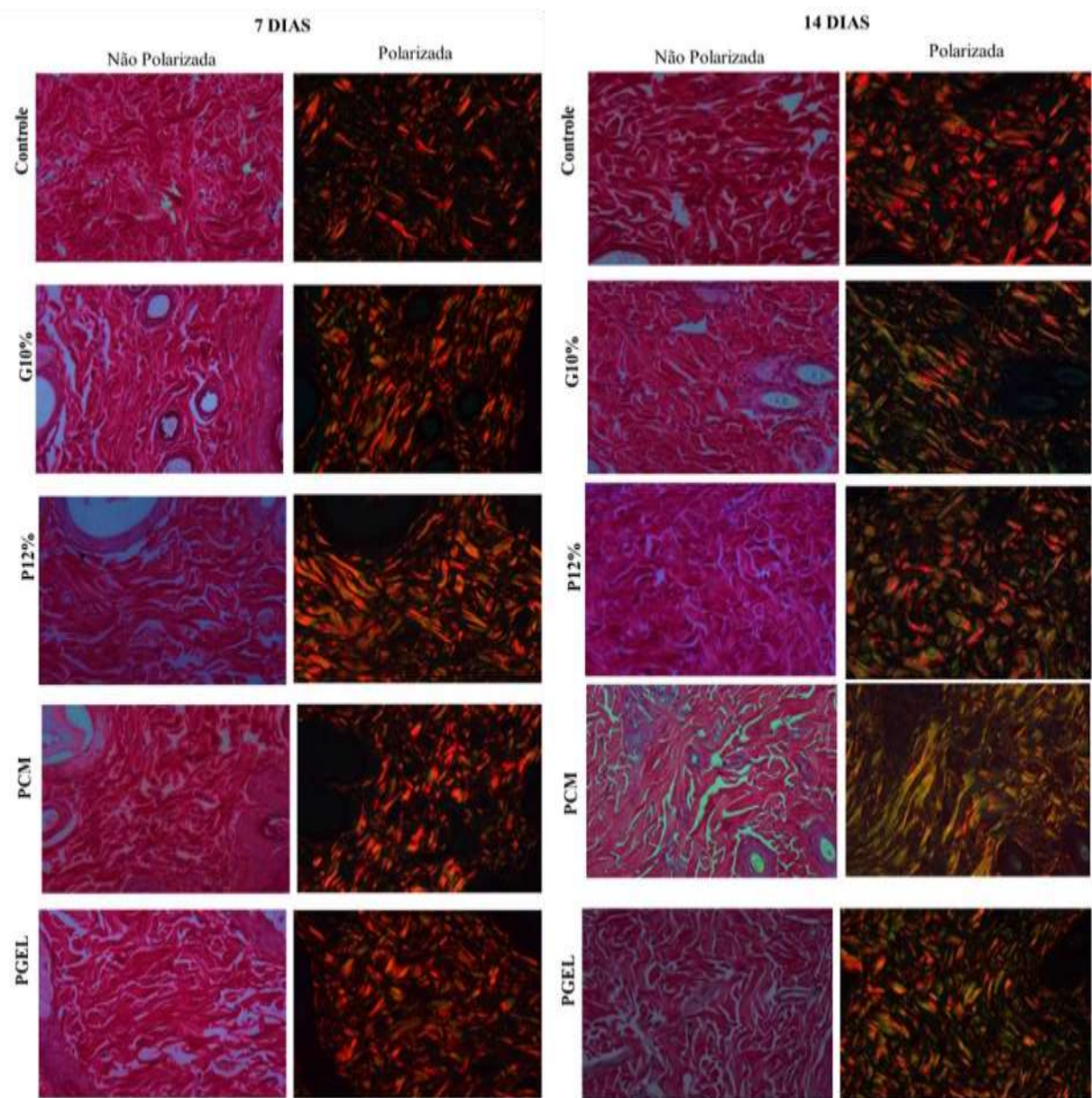
Figura 9 - Lâminas histológicas: Efeito das terapias no 7º e 14º dia de protocolo experimental nos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis modelo de indução diabétes em *Rattus norvegicus*



Fotomicrografias representativas retiradas do tecido ósseo coradas com HeE dos grupos Controle, G10%,P12%,PCM,Pgel . Todos os painéis foram obtidos na escala de 200 $\mu$ . Os pontos representam a média $\pm$  EPM do percentual de fibras de colágeno tipo III no 7º e 14º dia de protocolo experimental. Para análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde #  $p < 0,05$  vs grupo Controle 7 dias e \*  $p < 0,05$  vs grupo Controle 14 dias.

## APÊNDICE B – IMAGENS DE MICROSCOPIA POLARIZADA E NÃO POLARIZADA NO 7º E 14º DIA DE TRATAMENTO

Figura 10. Laminas histológicas: Efeito das terapias na porcentagem de colágeno no 7º e 14º dia de protocolo experimental nos curativos a base poliésteres modificados com hidrogéis modelo de indução da diabéticos em *Rattus novergicus*



Fotomicrografias representativas retiradas no 7º e 14º dia de protocolo experimental do tecido coradas com Picrosirius, de acordo com as identificações. Todos os painéis foram obtidos na escala de 200µ.

ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS -  
CEUA UNINOVAFAPI



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS -  
CEUA UNINOVAFAPI

Protocolo nº 008P/V2/2018 - Pesquisa


**PARECER DO COLEGIADO**

Certificamos que a proposta intitulada CURATIVOS À BASE DE POLIESTERES MODIFICADOS COM HIDROGÉIS COM POTENCIAL REGENERATIVO E ANTIMICROBIANO, sob a responsabilidade da Profa. **Franciléia Nogueira Albino Calland**, foi analisada em plenária pela CEUA-UNINOVAFAPI e considerada **APROVADA** por estar em concordância com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controla da Experimentação Animal - CONCEA, em reunião de 26/06/2018.

Salientamos que após o prazo da pesquisa o autor deverá encaminhar relatório final para a CEUA dentro de 30 dias.

Espécie	Linhagem	Idade	Peso aproximado	Quantidade		
				M	F	M + F
Rattus norvegicus	Wistar	60 dias	250 gramas			50

Teresina, 26 de junho de 2018

  
Fernando Luiz Lima de Oliveira  
Coordenador do CEUA UNINOVAFAPI

---

Prof Dr Fernando Luiz Lima de Oliveira  
Médico Veterinário CRMV 370 PI  
Coordenador da CEUA UNINOVAFAPI

## ANEXO B – Artigo submetido a materials letters

### Materials Letters

Evaluation of wound healing activity of GeIMA/PCLMA fibrous composites in diabetic model rats

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	MLBLUE-D-22-04382
Article Type:	Short Communication
Keywords:	Electrospinning; Bandages; Diabetes; Scaffolds; In vivo
Corresponding Author:	Anderson Oliveira Lobo, PhD Universidade Federal do Piauí Teresina, BRAZIL
First Author:	Francieleia Nogueira Albino Calland
Order of Authors:	Francieleia Nogueira Albino Calland Guilherme de Castro Brito Gustavo Fernandes de Sousa Francilio de Carvalho Oliveira Fernanda Roberta Marciano Anderson Oliveira Lobo, PhD
Abstract:	Diabetes Mellitus is a disease caused by insufficient production of insulin or its low absorption, promoting several consequences, among that a poor wound healing. This condition requires new strategies since these lesion type present limited treatment. Here, we produced different groups of multifunctional bandages using electrospinning and surface functionalization, then we evaluated the skin tissue regeneration using an in vivo diabetes model. The scaffolds displayed good tissue integration, evidenced by fibroblast adhesion and mature collagen (type I) formation. The group had developed this scaffold and it have been using for different biomedical applications.
Suggested Reviewers:	Thomas Webster websterthomas02@gmail.com  Ali Khademhosseini khademh@gmail.com  Amir Sheiki a.sheikhi86@gmail.com

Highlights (for review)

### **HIGHLIGHTS**

- Here, we produced multifunctional bandages using electrospinning;
- We evaluated the skin tissue regeneration using an *in vivo* diabetes model;
- We observed a mature collagen (type I) formation.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Evaluation of wound healing activity of GelMA/PCLMA fibrous composites in diabetic model rats**

Francileia Nogueira Albino Calland<sup>1</sup>, Guilherme de Castro Brito<sup>3</sup>, Gustavo Fernandes de Sousa<sup>3</sup>, Francilio de Carvalho Oliveira<sup>2</sup>, Fernanda Roberta Marciano<sup>2</sup>, Anderson Oliveira Lobo<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Biomedical Engineering Graduate Program, Brazil University, São Paulo 08230-030, Brazil.

<sup>2</sup> Estácio Faculty, Teresina, PI 64046-700, Brazil.

<sup>3</sup> LIMAV—Interdisciplinary Laboratory for Advanced Materials (LIMAV), Materials Science & Engineering Graduate Program (PPGCM), Federal University of Piauí (UFPI), Teresina 64049-550, PI, Brazil.

**Abstract**

New strategies are necessary to develop bandages to poor wound healing from diabetic patients. Here, we produced different groups of multifunctional bandages using electrospinning and surface functionalization, then we evaluated the skin tissue regeneration using an *in vivo* diabetes model. The scaffolds displayed good tissue integration, evidenced by fibroblast adhesion and mature collagen (type I) formation. The group had developed this scaffold and it have been using for different biomedical applications.

**Keywords:** Electrospinning; Bandages; Diabetes; Scaffolds; In vivo

## Introduction

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Diabetes Mellitus is a disease caused by insufficient production of insulin or its low absorption. The related effects include hyperglycemia, heart and arterial compromise, kidney impairment, what can cause death of patients[1]. Among the consequences, the poor wound healing is one of the most prevalent that develop from cross contamination, inducing chronic ulcers non-healing resulting in infection [2]. In this context, it is extremely necessary the development of new materials for treatment of lesions in diabetic patients.

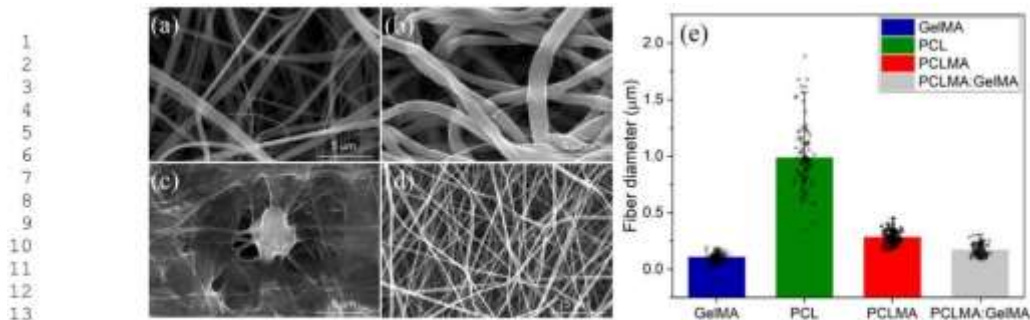
The GelMA (gelatin methacrylate) is a photocross-linkable hydrogel, non-cytotoxic and biodegradable, a product of methacrylic groups addition at the gelatin structure (similar to collagen from extracellular matrix), it is an appealing biomaterial for tissue engineering applications [3]. The use of GelMA is reported in different compositions of bandages [4,5]. The PCL (polycaprolactone) has been evidenced due to its biocompatible, biodegradable and mechanical resistant structure. The addition of methacrylate groups in the PCL chain possibility your cross-link, resulting in PCLMA (polycaprolactone methacrylate) a 3D scaffold that can increase your activity in different tissue engineering applications[6]. Recently, our group showed that PCLMA:GelMA fibrous scaffolds had a good bactericidal activity, low inflammatory response, good biodegradation, as well as optimal collagen-, stress fiber- and blood vessel formation [6]. Here, we showed for the first time that the developed PCLMA:GelMA fibrous scaffolds improved the wound healing process using an *in vivo* diabetic model. Interesting, our strategy was favorable to produce 93.8% of type I collagen after 14 days.

## Materials and method

PCLMA/GelMA bandages were produced and characterized as described elsewhere [6] and briefly at supplementary material. The diabetes model was induced by intravenous route of Streptozocin ( $0.1 - 0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) in Wistar *rattus norvegicus* (250 - 300 g), considering diabetic rats which one that present blood glucose  $> 200 \text{ mg dl}^{-1}$  in days 7 and 14 after treatment (more details about the glycemic values can be checked at Table S1 in supplementary information). Critical defects (depth 0.1 mm; diameter 1.0 cm) were made behind rats, then the bandages were put over the lesions. After day 14 the rats were euthanized, and the wound region was collected for histology study, fibroblasts and type I and III collagen quantification.

## Results

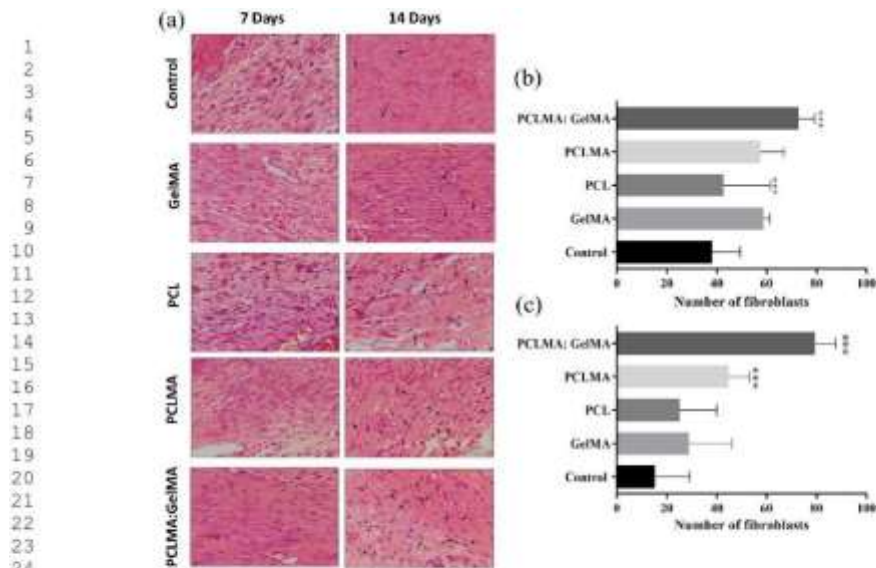
PCL bandage shows the higher fiber diameter with  $0.98 \pm 0.27 \mu\text{m}$  due to a rapidly volatilized of HFIP [7]. The structural modification of PCL with addition of methacrylate group must modify your mechanical and morphological properties. Then, the fiber diameter of PCLMA, a modified PCL decrease to  $0.28 \pm 0.05 \mu\text{m}$ , what can occur due the retraction obtained by the increase of crosslink after modification[6]. The membrane composed for GelMA and the mixture PCLMA:GelMA have not significative modification, since GelMA was measure  $0.10 \pm 0.03 \mu\text{m}$  and for PCLMA:GelMA  $0.16 \pm 0.05 \mu\text{m}$ . The SEM images (Figure 1a-d) shows the regular morphology, bead-free and good distribution of ultrathin fibers.



**Figure 1.** The morphology of the electrospun nanofibers obtained by scanning electron microscopy (SEM) of (a) GelMA, (b) PCL, (c) PCLMA and (d) PCLMA:GelMA. The fiber diameter measured for all the groups. Values are exposed as mean  $\pm$  SD, N = 100. ANOVA one-way ( $p < 0.05$ ) followed by a Tukey's multiple comparisons test.

The good electrospinning process bandages must develop microenvironments that mimic native tissues with good physical and biochemical characteristics achieved by incorporation of biomolecules for promote better cell-scaffold interaction[8].

The bandages were implanted into skin rats. Photos of the (i) skin wounds closure, (ii) measure of defect size, (iii) wounds marked, (iv) bandages used for treatment and (v) wound healing process after 7 days can be checked in supplementary information (Figure S1). Figure 2a shows the number of fibroblasts founded in the healed region, the fibroblasts were characterized like a clear, big, and elliptic cellular nucleus with evident nucleolus and thin chromatin, what indicate intense transcription of genetic information. The fibroblasts are the main cells involved in the wound healing process with the function the integrity maintenance of the connective tissue through the synthesis of ECM components [9].

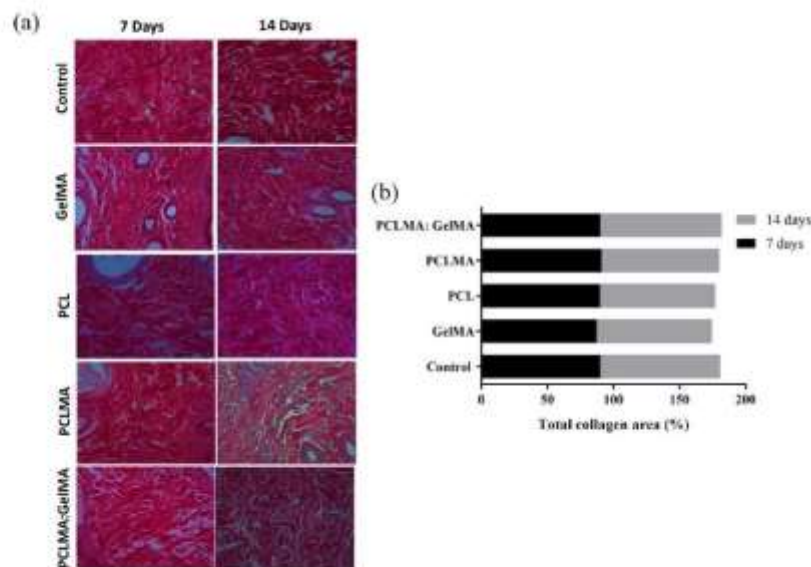


**Figure 2.** The histology of healed region using hematoxylin and eosin (H & E) staining at a magnification (200x). (a) the photomicrographs of each group in the day 7 and 14 after treatment. Number of fibroblasts obtained from the histology for (b) day 7 and (c) day 14. Black arrows (→) show fibroblasts. Values are exposed as mean ± SD, ANOVA one-way, N = 10. Kruskal-Wallis (nonparametric data) and Dunn's, \*\*\* p < 0.05 vs control.

After 7 days (Figure 2b) the number of fibroblasts increased for GelMA ( $58.70 \pm 2.53\%$ ), PCLMA ( $57.45 \pm 9.69\%$ ) and PCLMA:GelMA ( $72.66 \pm 6.55\%$ ) compared to control ( $38.13 \pm 11.21\%$ ), what could indicate a good tissue recovery[9]. Figure 2c represents the number of fibroblasts 14 days after treatment, here the highlight for the PCLMA:GelMA group with high presence of cells ( $79.18 \pm 8.40\%$ ) compared to control ( $15.07 \pm 14.19\%$ ), this result shows the good property associated with the combination of PCLMA and GelMA in the proliferation of fibroblasts into the scaffold. This behavior corroborates with the observed morphology of the fibers, where the PCLMA:GelMA

group had a most regular fiber, with a diameter ( $0.16 \pm 0.05 \mu\text{m}$ ) that despite major than GelMA ( $0.10 \pm 0.03 \mu\text{m}$ ) have most uniform pattern, forming interconnected pores that facilitate the cell migration.

Figure 3a demonstrates the total collagen area visualized by non-polarized light microscopy of the picrosirius red structures. The collagen is a key component into the healing process, it is a principal structure of the extracellular matrix and have critical activities in the phase regulation of wound healing[10]. The Figure 4a, the clear points represent the absence of total collagen, while the rose tone is a collagen formation.

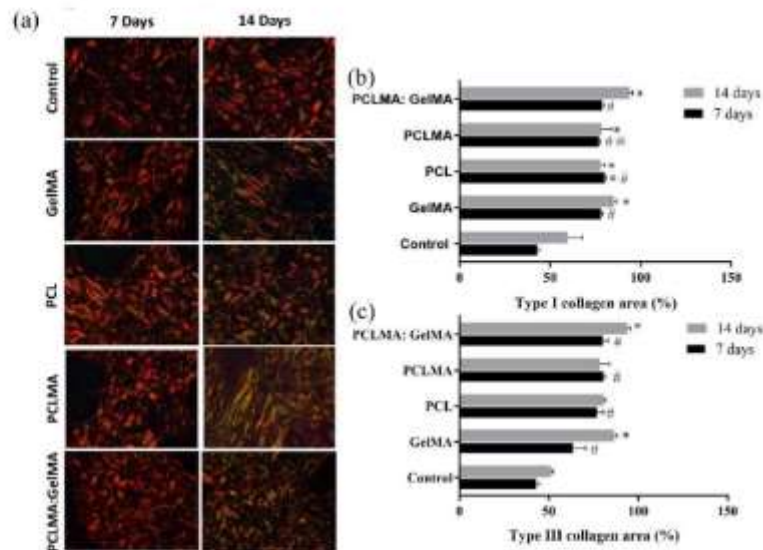


**Figure 3.** The histology of healed region using picrosirius red staining at a magnification (200 x), non-polarized. (a) the photomicrographs of each group in the day 7 and 14 after treatment. Total collagen area obtained from the histology for (b) day 7 and 14. Values are exposed as mean  $\pm$  SD, N = 6. ANOVA two-way ( $p < 0.05$ ) Bonferroni.

Figure 4b, the total collagen count obtained by quantification of color. All the groups demonstrated a good collagen formation, what indicate a wound healing process.

The best result was found in the PCLMA:GelMA group that showed 181.6% of total collagen area after 14 days, the control group had 180.8%, what indicate not significant difference.

The Figure 4a indicates the presence of type I and III collagen, counted by polarized light microscopy evidenced by the picosirius red staining, where the type I collagen present the color reddish yellow while the type III collagen is showed whitish green. The type I is the principal collagen, since participate both the integrity maintenance most of tissues due your mechanical characteristics and your functional activity of interaction with the cells present in ECM [10]. The type III is the first produced collagen during the healing process, it is formed in the proliferative phase and have more rough aspect than the health skin collagen, it is gradually changed by the type I, what promote a major resistance to a healed skin[10].



**Figure 4.** The histology of healed region using picosirius red staining at a magnification (200 x), non-polarized. (a) the photomicrographs of each group in the day 7 and 14 after treatment. (b) Type I collagen area for day 7 and 14, (c) Type III collagen area for day 7

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

and 14, obtained from the histology. Values are exposed as mean  $\pm$  SD, N = 6. ANOVA two-way ( $p < 0.05$ ) Bonferroni.

The Figure 4b indicates the type I collagen area, it can observe the significant increase in all groups, GelMA ( $78.20 \pm 0.54\%$ ), PCL ( $80.40 \pm 0.42\%$ ), PCLMA ( $77.00 \pm 0.50\%$ ) and PCLMA:GelMA ( $79.00 \pm 0.51\%$ ) compared with the control ( $43.00 \pm 0.56\%$ ) at day 7. At day 14 all groups had a best results compared to control again, but the PCLMA:GelMA promoted almost total area ( $93.80 \pm 0.51\%$ ) completed with type I collagen, this phenomenon indicates a great recovery of a functional tissue. The Figure 4c presents the results of presence of type III collagen, at day 7 and 14, here all the groups have significative difference compared with the control, without difference each other, the PCLMA:GelMA group demonstrate great result ( $93.80 \pm 0.52\%$ ), indicating your potential use in wound healing.

### Conclusion

It was produced PCLMA:GelMA-based scaffolds and applied in wound healing process *in vivo* diabetic model. The scaffolds present good biodegradability and was totally absorbed in the *in vivo* model. The blanket-form facility the quick application of the bandage on the wound. The fibroblasts proliferation and type I and type III collagen formation suggest the PCLMA:GelMA obtained the best result, showing 79.18% of fibroblasts presence, 93.8% of type I collagen formation at day 14 after lesion, thus beneficial in skin tissue repair *in vivo* diabetic model.

**Acknowledgement:** Special thanks to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, #310883/2020-2, #404683/2018-5 and #303752/2017-3 to AOL; and #311531/2020-2 to FRM) for financial support.

**Data Availability Statement:** The data can be requested to corresponding author.

## References

1. Andleeb, A.; Mehmood, A.; Tariq, M.; Butt, H.; Ahmed, R.; Andleeb, A.; Ghufraan, H.; Ramzan, A.; Ejaz, A.; Malik, K.; et al. Hydrogel patch with pretreated stem cells accelerates wound closure in diabetic rats. *Biomater. Adv.* **2022**, 213150, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213150>.
2. Li, G.; Wang, Q.; Feng, J.; Wang, J.; Wang, Y.; Huang, X.; Shao, T.; Deng, X.; Cao, Y.; Zhou, M.; et al. Recent insights into the role of defensins in diabetic wound healing. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, 155, 113694, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113694>.
3. Yang, Z.; Ren, X.; Liu, Y. Multifunctional 3D printed porous GelMA/xanthan gum based dressing with biofilm control and wound healing activity. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, 131, 112493, doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112493>.
4. Cao, W.; Peng, S.; Yao, Y.; Xie, J.; Li, S.; Tu, C.; Gao, C. A nanofibrous membrane loaded with doxycycline and printed with conductive hydrogel strips promotes diabetic wound healing in vivo. *Acta Biomater.* **2022**, 152, 60–73, doi:<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.08.048>.
5. Augustine, R.; Hasan, A.; Dalvi, Y.B.; Rehman, S.R.U.; Varghese, R.; Unni, R.N.; Yalcin, H.C.; Alfkey, R.; Thomas, S.; Al Moustafa, A.-E. Growth factor loaded in situ photocrosslinkable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/gelatin methacryloyl hybrid patch for diabetic wound healing. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, 118, 111519, doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111519>.
6. Afewerki, S.; Bassous, N.; Harb, S.V.; Corat, M.A.F.; Maharjan, S.; Ruiz-Esparza, G.U.; de Paula, M.M.M.; Webster, T.J.; Tim, C.R.; Viana, B.C.; et al. Engineering

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

multifunctional bactericidal nanofibers for abdominal hernia repair. *Commun.*

*Biol.* **2021**, *4*, 233, doi:10.1038/s42003-021-01758-2.

7. Goreninskii, S.; Danilenko, N.; Bolbasov, E.; Evtina, A.; Buldakov, M.; Cherdyntseva, N.; Saqib, M.; Beshchasna, N.; Opitz, J.; Filimonov, V.; et al. Enhanced properties of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/polyvinylpyrrolidone electrospun scaffolds fabricated using 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol. *J. Appl. Polym. Sci.* **2021**, *138*, doi:10.1002/app.50535.
8. Afsharian, Y.P.; Rahimnejad, M. Bioactive electrospun scaffolds for wound healing applications: A comprehensive review. *Polym. Test.* **2021**, *93*, 106952, doi:https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106952.
9. Talbott, H.E.; Mascharak, S.; Griffin, M.; Wan, D.C.; Longaker, M.T. Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis. *Cell Stem Cell* **2022**, *29*, 1161–1180, doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.07.006.
10. Mathew-Steiner, S.S.; Roy, S.; Sen, C.K. Collagen in Wound Healing. *Bioeng. (Basel, Switzerland)* **2021**, *8*, doi:10.3390/bioengineering8050063.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Declaration of Interest Statement

**Declaration of interests**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

### *SEM analysis*

The scanning electronic microscope (Quanta FEG-250, FEI) was used to obtain micrographs and the morphology of fibers. A thin film of gold was sputtered on the surface of membranes. Then the analysis carried out using 15 kV acceleration tension, spot 3.0 and 10 mm of work distance.

### *Contact angle measurement*

The dry membranes were positioned on a straight surface, then deionized water was dropped and images ( $n = 20$ ) were recorded after 10 seconds of stabilization. The images were treated using Image J software to calculate the contact angle.

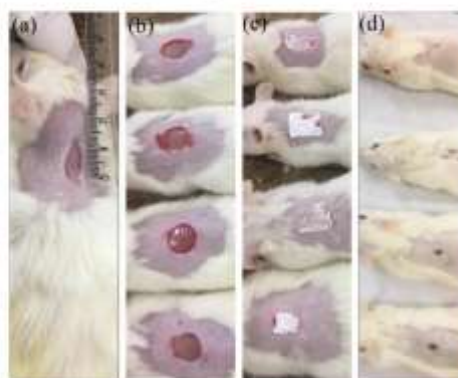


Figure S1. Photos of the skin wounds closure. (a) Measure of defect size. (b) The wounds made in all groups. (c) The bandages used for treatment. (d) The wound healing process after 7 days.

## Supplementary Information

### Materials

The following chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): Gelatin (Type A, from porcine skin), PCL (Mn 80,000), MA (methacrylic anhydride), 3-(Trimethoxysilyl) propyl methacrylate, Irgacure 2959 (2-hydroxy-1-[4-(hydroxyethoxy) phenyl]-2-methyl-1-propanone), Streptozocin. HFIP (Hexafluoroisopropan-2-ol) was bought from Oakwood Chemical.

### Methods

#### *Synthesis of GelMA*

The GelMA was obtained by Gelatin type A from porcine skin dissolution in PBS at 50 °C. Then methacrylic anhydride was added and stirred for 3 h at 50 °C. The material was dialyzed against deionized water for 4 days and finally lyophilized to GelMA.

#### *Synthesis of PCLMA*

The electrospun fibers of PCL was treated with oxygen plasma (Anatech SP-100) for 5 min at 100 W to add reactive hydroxyl groups on the surface. Then the functionalized PCL-OH was immediately immersed in 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate for 24 h at 25 °C. After, the material was washed with deionized water 10 times to remove all unreacted silane group and dried under vacuum to obtain methacrylated PCLMA group.

#### *Electrospinning of PCLMA:GelMA bandages*

The conditions were controlled ambient temperature  $21 \pm 2$  °C, humidity  $45 \pm 5\%$ , The electrospinning process carried out through the following parameters: voltage 17 kV (Bertan 230, Champaign, IL, USA); collector distance 10 cm; rate  $1 \text{ mL h}^{-1}$ . More details about Materials and Methods can be checked in Supplementary information.

Table S1. Glycemic values of animals treated with Streptozocin (0.1 - 0.3 mg kg<sup>-1</sup>) in Wistar *rattus norvegicus* (250 - 300 g) at 7 and 14 days.

	7 days			14 days		
	Before treatment	After treatment	During euthanasia	Before treatment	After treatment	During euthanasia
	Control (n = 4)					
Mean (mg/dL)	85.75	556.25	550.5	88.33	557.33	535.00
	G10% (n = 4)					
Mean (mg/dL)	102.00	423.75	412.50	83.25	464.00	462.75
	P12% (n = 5)					
Mean (mg/dL)	87.40	473.00	513.80	83.50	464.00	457.50
	PCM (n = 4)					
Mean (mg/dL)	83.25	460.00	456.00	85.00	556.00	267.00
	PGel (n = 4)					
Mean (mg/dL)	87.50	271.50	262.50	78.00	448.60	422.00



Contents lists available at ScienceDirect

Materials Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/matlet](http://www.elsevier.com/locate/matlet)

## Evaluation of wound healing activity of GelMA/PCLMA fibrous composites in diabetic model rats

Francieleia Nogueira Albino Calland<sup>a</sup>, Guilherme de Castro Brito<sup>c</sup>, Gustavo Fernandes de Sousa<sup>c</sup>, Francilio de Carvalho Oliveira<sup>b</sup>, Fernanda Roberta Marciano<sup>a</sup>, Anderson Oliveira Lobo<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Biomedical Engineering Graduate Program, Brazil University, São Paulo 06233-030, Brazil

<sup>b</sup> Centro Universitário UNINOVAFAP, Teresina, PI 64073-505, Brazil

<sup>c</sup> LIMAV—Interdisciplinary Laboratory for Advanced Materials (LIMAV), Materials Science & Engineering Graduate Program (PPGCM), Federal University of Piauí (UFPI), Teresina 64049-550, PI, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Electrospinning  
Bandages  
Diabetes  
Scaffolds

### ABSTRACT

New strategies are necessary to develop bandages to poor wound healing from diabetic patients. Here, we produced different groups of multifunctional bandages using electrospinning and surface functionalization, then we evaluated the skin tissue regeneration using an *in vivo* diabetes model. The bandages displayed good tissue integration, evidenced by fibroblast adhesion and mature collagen (type I) formation. The group have developed these biomaterials and it have been using for different biomedical applications.

### 1. Introduction

Diabetes Mellitus is a disease caused by insufficient production of insulin or its low absorption. The related effects include hyperglycemia, heart and arterial compromise, kidney impairment, causing death of patients [1]. Among the consequences, the poor wound healing is one of the most prevalent that develop from cross contamination, inducing chronic ulcers non-healing resulting in infection [2]. In this context, it is extremely necessary the development of new materials for treatment of lesions in diabetic patients.

The GelMA (gelatin methacrylate) is a photocross-linkable hydrogel, non-cytotoxic and biodegradable, a product of methacrylic groups addition at the gelatin structure (similar to collagen from extracellular matrix), it is an appealing biomaterial for tissue engineering applications [3]. The use of GelMA is reported in different compositions of bandages [4,5]. The PCL (polycaprolactone) has been evidenced due to its biocompatible, biodegradable and mechanical resistant structure. The addition of methacrylate groups in the PCL chain possibility its cross-link, resulting in PCLMA (polycaprolactone methacrylate) a 3D scaffold that can increase its activity in different tissue engineering applications [6]. Recently, our group showed that PCLMA-GelMA fibrous scaffolds had a good bactericidal activity, low inflammatory response, good biodegradation, as well as optimal collagen-, stress fiber- and blood vessel formation [6]. Here, we showed for the first time that the developed PCLMA-GelMA fibrous bandages improved the wound healing process using an *in vivo* diabetic model. Interesting, our strategy was favorable to produce 93.3% of type I collagen after 14 days.

### 2. Materials and method

PCLMA/GelMA bandages were produced and characterized as described elsewhere [6] and briefly at [Supplementary Material](#). The diabetes model was induced by intravenous route of Streptozotocin ( $0.1\text{--}0.3\text{ mg kg}^{-1}$ ) in *Wistar rat*us *novergicus* (250–300 g), considering diabetic rats which one that present blood glucose  $> 200\text{ mg dl}^{-1}$  in days 7 and 14 after treatment (more details about the glycemic values can be checked at [Table S1 in Supplementary Information](#)) (Ethical Committee on Animal Experimentation - UNINOVAFAP n°008/V2/2018). Critical defects (depth 1.0 mm; diameter 1.0 cm) were made on the back of each rat, exposing epidermis and dermis, then the bandages were put over the lesions. The control group in all tests did not receive any type of treatment other than injury. After day 14 the rats were euthanized, and the wound region was collected for histology study, fibroblasts and type I and III collagen quantification.

### 3. Results

PCL bandage shows the higher fiber diameter with  $0.98 \pm 0.27\text{ }\mu\text{m}$  due to a rapidly volatilized of HSP [7]. The structural modification of PCL with addition of methacrylate group must modify its mechanical and morphological properties. Then, the fiber diameter of PCLMA, a modified PCL decrease to  $0.28 \pm 0.05\text{ }\mu\text{m}$ , what can occur due the retraction obtained by the increase of crosslink after modification [8]. The membrane composed for GelMA and the mixture PCLMA-GelMA have not significative modification, since GelMA was measure  $0.10 \pm$

<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2023.131093>

Received 10 November 2022; Received in revised form 26 December 2022; Accepted 14 January 2023

Available online 16 January 2023

0167-577X/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

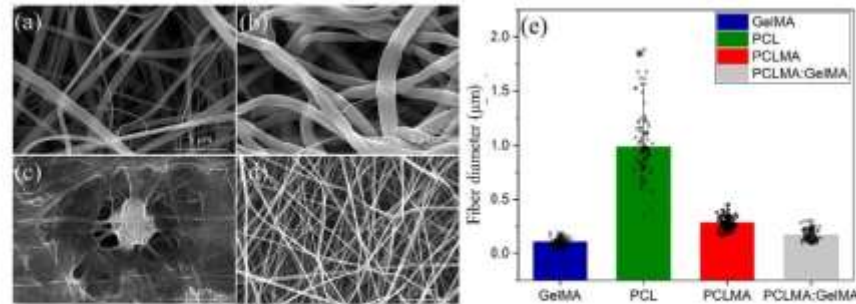


Fig. 1. The morphology of the electrospun nanofibers obtained by scanning electron microscopy (SEM) of (a) GeMA, (b) PCL, (c) PCLMA and (d) PCLMA:GeMA. The fiber diameter measured for all the groups. Values are exposed as mean  $\pm$  SD,  $N = 100$ . ANOVA one-way ( $p < 0.05$ ) followed by a Tukey's multiple comparisons test.

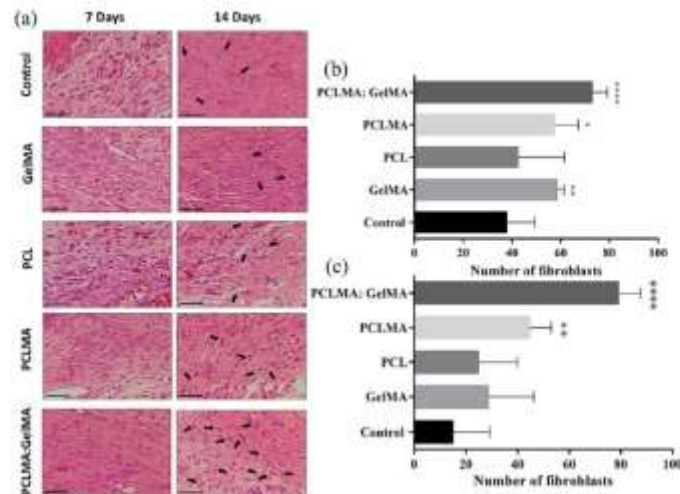


Fig. 2. The histology of healed region using hematoxylin and eosin (H & E) staining at a magnification (200x). (a) the photomicrographs of each group in the day 7 and 14 after treatment. Number of fibroblasts obtained from the histology for (b) day 7 and (c) day 14. Black arrows (→) show fibroblasts. Values are exposed as mean  $\pm$  SD. ANOVA one-way,  $N = 10$ . Kruskal-Wallis (nonparametric data) and Dunn's,  $*** p < 0.05$  vs control.

0.03  $\mu\text{m}$  and for PCLMA:GeMA 0.16  $\pm$  0.05  $\mu\text{m}$ . The SEM images (Fig. 1a–d) shows the regular morphology, bend-free and good distribution of ultrathin fibers.

The bandages were implanted into skin rats. Photos of the (i) skin wounds closure, (ii) measure of defect size, (iii) wounds marked, (iv) bandages used for treatment and (v) wound healing process after 7 days can be checked in [Supplementary Information](#) (Fig. 3). Fig. 2a shows the number of fibroblasts founded in the healed region, the fibroblasts were characterized like a clear, big, and elliptic cellular nucleus with evident nucleolus and thin chromatin, what indicate intense transcription of genetic information. The fibroblasts are the main cells involved in the wound healing process with the function the integrity maintenance of the connective tissue through the synthesis of ECM components [6].

After 7 days (Fig. 2b) the number of fibroblasts increased for GeMA

(58.70  $\pm$  2.53 %), PCLMA (57.45  $\pm$  9.69 %) and PCLMA:GeMA (72.66  $\pm$  6.55 %) compared to control (38.13  $\pm$  11.21 %), what could indicate a good tissue recovery[6]. Fig. 2c represents the number of fibroblasts 14 days after treatment, here the highlight for the PCLMA:GeMA group with high presence of cells (79.18  $\pm$  8.40 %) compared to control (15.07  $\pm$  14.19 %), this result shows the good property associated with the combination of PCLMA and GeMA in the proliferation of fibroblasts into formed tissue. This behavior corroborates with the observed morphology of the fibers, where the PCLMA:GeMA group had a most regular fiber, with a diameter (0.16  $\pm$  0.05  $\mu\text{m}$ ) that despite major than GeMA (0.10  $\pm$  0.03  $\mu\text{m}$ ) have most uniform pattern, forming interconnected pores that facilitate the cell migration.

Fig. 3a demonstrates the total collagen area visualized by non-polarized light microscopy of the picrosirius red structures. Fig. 3b

show the quantification of total collagen area. The collagen is a key component into the healing process, it is a principal structure of the extracellular matrix and have critical activities in the phase regulation of wound healing [9]. The Fig. 4a, the clear points represent the absence of total collagen, while the rose tone is a collagen formation. The count of total collagen area saw in Fig. 3b, besides non-significant results, indicate a formation of collagen equivalent to a control.

Fig. 4b, the total collagen count obtained by quantification of color. All the groups demonstrated a good collagen formation, what indicate a wound healing process. The best result was found in the PCLMA:GelMA group that showed 181.6 % of total collagen area after 14 days, the control group had 100.0 %, what indicate not significant difference.

The Fig. 4a indicates the presence of type I and III collagen, counted by polarized light microscopy evidenced by the picrosirius red staining, where the type I collagen present the color reddish yellow while the type III collagen is showed whitish green. The type I is the principal collagen, since participate both the integrity maintenance most of tissues due its mechanical characteristics and its functional activity of interaction with the cells present in ECM [9]. The type III is the first produced collagen during the healing process, it is formed in the proliferative phase and have more rough aspect than the health skin collagen, it is gradually changed by the type I, what promote a major resistance to a healed skin [9].

The Fig. 4b indicates the type I collagen area, it can observe the significant increase in all groups, GelMA (78.20 ± 0.54 %), PCL (80.40 ± 0.42 %), PCLMA (77.00 ± 0.50 %) and PCLMA:GelMA (79.00 ± 0.51 %) compared with the control (43.00 ± 0.56 %) at day 7. At day 14 all groups had a best results compared to control again, but the PCLMA:GelMA promoted almost total area (93.80 ± 0.51 %) completed with type I collagen, this phenomenon indicates a great recovery of a functional tissue. The Fig. 4c presents the results of presence of type III collagen, at day 7 and 14, here all the groups have significative difference compared with the control, without difference each other, the PCLMA:GelMA group demonstrate great result (93.80 ± 0.52 %), indicating its potential use in wound healing.

#### 4. Conclusion

It was produced PCLMA:GelMA-based bandages and applied in wound healing process in vivo diabetic model. The bandages present good biodegradability and was totally absorbed in the in vivo model. The blanket-form facility the quick application of the bandage on the wound. The fibroblasts proliferation and type I and type III collagen formation suggest the PCLMA:GelMA obtained the best result, showing 79.18 % of fibroblasts presence, 93.8 % of type I collagen formation at day 14 after lesion, thus beneficial in skin tissue repair in vivo diabetic model.

#### CRedit authorship contribution statement

**Francielei Nogueira Albino Calland:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Guilherme de Castro Brito:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Gustavo Fernandes de Sousa:** Methodology, Resources, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing,

Visualization. **Francilio de Carvalho Oliveira:** Writing – review & editing, Supervision. **Fernanda Roberta Marciano:** Writing – review & editing, Supervision. **Anderson Oliveira Lobo:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Data availability

Data will be made available on request.

#### Acknowledgement

Special thanks to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, #310883/2020-2, #404663/2018-5 and #303752/2017-3 to AOL; and #311531/2020-2 to FRM) for financial support.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2023.133899>.

#### References

- [1] A. Anleeb, A. Mohamed, M. Tazig, H. Butt, B. Alhand, A. Anleeb, H. Ghafur, A. Razaan, A. Ejan, K. Malik, et al., Hydrogel patch with pretreated stem cells accelerates wound closure in diabetic rat. *Biomater. Adv.* 213150 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.biomadv.2022.213150>.
- [2] G. Li, Q. Wang, J. Feng, J. Wang, Y. Wang, X. Huang, T. Shao, X. Deag, Y. Cao, M. Zhou, et al., Recent insights into the role of defensins in diabetic wound healing. *Biomol. Pharmacol.* 155 (2022), 119694. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.119694>.
- [3] Z. Yang, X. Ren, Y. Liu, Multifunctional 3D printed porous GelMA/xanthan gum based dressing with heparin channel and wound healing activity. *Mater. Sci. Eng. C* 131 (2021), 112493. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112493>.
- [4] W. Cao, S. Peng, Y. Yao, J. Xie, S. Li, C. Yu, C. Guo, A nanofiber membrane loaded with doxycycline and grafted with chondroitin hydrogel strips promotes diabetic wound healing in vivo. *Acta Biomater.* 152 (2022) 60–73. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.03.046>.
- [5] R. Augustine, A. Hama, Y.B. Dalvi, S.R.U. Beltrami, R. Varghese, R.N. Usini, H. C. Yalcin, B. Alibey, S. Thaman, A.-E. Al Montafy, Growth factor loaded in situ photocrosslinkable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/gelatin methacryloyl hybrid patch for diabetic wound healing. *Mater. Sci. Eng. C* 118 (2021), 111519. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111519>.
- [6] S. Alievskii, N. Ramona, S.Y. Harb, M.A.S. Corat, S. Maharjan, G.U. Ruiz-Exarza, M. M.M. de Paula, T.J. Webster, G.R. Tint, B.C. Viana, D. Wang, X. Wang, F. R. Marciano, A.O. Lobo, Engineering multifunctional bioceramic nanofibers for abdominal hernia repair. *Compos. Biol.* 4 (1) (2021). <https://doi.org/10.1039/c0cb00002a>.
- [7] E. Golezinski, M. Tomilaska, S. Bellanar, A. Britz, M. Bulbulov, N. Chernyagina, M. Singh, N. Baidarkina, J. Opim, V. Filizova, S. Tsvetkikhov, Enhanced properties of poly(ε-caprolactone)/polyvinylpyrrolidone electrospun scaffold fabricated using 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol. *J. Appl. Polym. Sci.* 138 (20) (2021). <https://doi.org/10.1002/app.51055>.
- [8] H.E. Talbot, S. Muehlan, M. Griffin, D.C. Wan, M.T. Longaker, Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis. *Cell Stem Cell* 29 (2022) 1161–1180. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.07.006>.
- [9] S.S. Mathew-Stelzer, S. Roy, C.E. Sen, Collagen in wound healing. *Bioengineering* 8 (2021). <https://doi.org/10.3390/bioengineering809061>.

show the quantification of total collagen area. The collagen is a key component into the healing process, it is a principal structure of the extracellular matrix and have critical activities in the phase regulation of wound healing [9]. The Fig. 4a, the clear points represent the absence of total collagen, while the rose tone is a collagen formation. The count of total collagen area saw in Fig. 3b, besides non-significant results, indicate a formation of collagen equivalent to a control.

Fig. 4b, the total collagen count obtained by quantification of color. All the groups demonstrated a good collagen formation, what indicate a wound healing process. The best result was found in the PCLMA:GelMA group that showed 181.6 % of total collagen area after 14 days, the control group had 100.0 %, what indicate not significant difference.

The Fig. 4a indicates the presence of type I and III collagen, counted by polarized light microscopy evidenced by the picrosirius red staining, where the type I collagen present the color reddish yellow while the type III collagen is showed whitish green. The type I is the principal collagen, since participate both the integrity maintenance most of tissues due its mechanical characteristics and its functional activity of interaction with the cells present in ECM [9]. The type III is the first produced collagen during the healing process, it is formed in the proliferative phase and have more rough aspect than the health skin collagen, it is gradually changed by the type I, what promote a major resistance to a healed skin [9].

The Fig. 4b indicates the type I collagen area, it can observe the significant increase in all groups, GelMA (78.20 ± 0.54 %), PCL (80.40 ± 0.42 %), PCLMA (77.00 ± 0.50 %) and PCLMA:GelMA (79.00 ± 0.51 %) compared with the control (43.00 ± 0.56 %) at day 7. At day 14 all groups had a best results compared to control again, but the PCLMA:GelMA promoted almost total area (93.80 ± 0.51 %) completed with type I collagen, this phenomenon indicates a great recovery of a functional tissue. The Fig. 4c presents the results of presence of type III collagen, at day 7 and 14, here all the groups have significative difference compared with the control, without difference each other, the PCLMA:GelMA group demonstrate great result (93.80 ± 0.52 %), indicating its potential use in wound healing.

#### 4. Conclusion

It was produced PCLMA:GelMA-based bandages and applied in wound healing process in vivo diabetic model. The bandages present good biodegradability and was totally absorbed in the in vivo model. The blanket-form facility the quick application of the bandage on the wound. The fibroblasts proliferation and type I and type III collagen formation suggest the PCLMA:GelMA obtained the best result, showing 79.18 % of fibroblasts presence, 93.8 % of type I collagen formation at day 14 after lesion, thus beneficial in skin tissue repair in vivo diabetic model.

#### CRedit authorship contribution statement

Francieleia Nogueira Albino Calland: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing. Guilherme de Castro Brito: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing. Gustavo Fernandes de Sousa: Methodology, Resources, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Visualization. Francilio de Carvalho Oliveira: Writing – review & editing, Supervision. Fernanda Roberta Marcianno: Writing – review & editing, Supervision. Anderson Oliveira Lobo: Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Data availability

Data will be made available on request.

#### Acknowledgement

Special thanks to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, #310683/2020-2, #404663/2010-5 and #303752/2017-3 to AOL; and #311531/2020-2 to FRM) for financial support.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2023.123899>.

#### References

- [1] A. Anifloeb, A. Mohamed, M. Tariq, H. Butt, B. Ahmad, A. Anifloeb, H. Ghadim, A. Razaan, A. Ejan, K. Malik, et al., Hydrogel patch with pretreated stem cells accelerates wound closure in diabetic rat. *Biomater. Adv.* 213150 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213150>.
- [2] G. Li, Q. Wang, J. Peng, J. Wang, Y. Wang, K. Huang, T. Shao, X. Deng, Y. Guo, M. Zhou, et al., Recent insight into the role of deferoxime in diabetic wound healing. *Biomater. Pharmacother.* 153 (2022), 113698. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113698>.
- [3] Z. Yang, X. Ren, Y. Liu, Multifunctional 3D printed porous GelMA/chitosan granule-based dressing with biofilm control and wound healing activity. *Mater. Sci. Eng. C* 131 (2021), 112493. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112493>.
- [4] W. Cao, S. Peng, Y. Yao, J. Xie, S. Li, C. Tu, C. Guo, A nanofiberous membrane loaded with doxycycline and printed with conductive hydrogel strips promotes diabetic wound healing in vivo. *Acta Biomater.* 152 (2022) 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.08.046>.
- [5] E. Augustine, A. Hassan, Y.B. Dubé, S.R.U. Belizari, R. Varghese, R.N. Usaid, H. C. Yakin, R. Akhbar, S. Thasana, A. E. Al Montafá, Growth factor loaded in situ photocrosslinkable poly(3-hydroxybutyrate-co-9-hydroxyvalerate)/gelatin methacryloyl hybrid patch for diabetic wound healing. *Mater. Sci. Eng. C* 118 (2021), 111519. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111519>.
- [6] S. Alievskii, N. Razonov, S.V. Hazb, M.A.B. Corat, S. Makarjan, G.U. Ruiz-España, M. M.M. de Paula, T.J. Webster, G.R. Tim, B.C. Viana, D. Wang, X. Wang, F. R. Marcianno, A.O. Lobo, Engineering multifunctional bioresorbable nanofibers for abdominal hernia repair. *Compos. Biol.* 4 (1) (2021). <https://doi.org/10.1016/j.cob.2020.02.001>.
- [7] S. Govevashki, N. Doncheva, S. Balazov, A. Bertin, M. Baidakov, N. Gherghevanova, M. Saqib, N. Berichkova, J. Opim, V. Filizova, S. Tsvetkova, Enhanced properties of poly(L-capsularone)/poly(vinylpyrrolidone) electrospun scaffolds fabricated using 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol. *J. Appl. Polym. Sci.* 138 (20) (2021). <https://doi.org/10.1002/app.50535>.
- [8] H.E. Talbot, S. Mousharraf, M. Griffin, D.C. Wan, M.T. Longaker, Wound healing: fibroblast heterogeneity, and fibrosis. *Cell Stem Cell* 29 (2022) 1161–1180. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.07.006>.
- [9] S.S. Mathew-Steiner, S. Roy, C.E. Sen, Collagen in wound healing. *Bioengineering* 8 (2021). <https://doi.org/10.3390/bioengineering805065>.