

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS**

JÉSSICA PEIXOTO RODRIGUES

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE *SCAFFOLDS* HÍBRIDOS A BASE DE
COLÁGENO CONTENDO MOLÉCULAS BIOATIVAS NO REPARO DE FERIDAS
CUTÂNEAS**

Uberlândia
Dezembro - 2022

JÉSSICA PEIXOTO RODRIGUES

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE *SCAFFOLDS* HÍBRIDOS A BASE DE COLÁGENO CONTENDO MOLÉCULAS BIOATIVAS NO REPARO DE FERIDAS CUTÂNEAS

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.

Uberlândia
Dezembro – 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R696d
2022

Rodrigues, Jéssica Peixoto, 1988-
Desenvolvimento e avaliação de scaffolds híbridos a base de colágeno contendo moléculas bioativas para reparo tecidual em feridas cutâneas [recurso eletrônico] / Jéssica Peixoto Rodrigues. - 2022.

Orientador: Marcelo Emilio Beletti.
Coorientadora: Natássia Caroline Resende Corrêa.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.7032>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Imunologia. I. Beletti, Marcelo Emilio, 1964-, (Orient.). II. Corrêa, Natássia Caroline Resende, 1983-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Glória Aparecida
Bibliotecária Documentalista - CRB-6/2047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada

Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado nº 151				
Data:	22/12/2022	Hora de início:	08:00	Hora de encerramento:	11:30
Matrícula do Discente:	11813IPA003				
Nome do Discente:	Jéssica Peixoto Rodrigues				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento e avaliação de <i>scaffolds</i> híbridos a base de colágeno contendo moléculas bioativas no reparo de feridas cutâneas				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das interações entre patógenos e seus hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de um <i>scaffold</i> de colágeno para aplicação <i>in vivo</i> em modelo experimental de feridas cutâneas				

No dia 22/12/2022, às 08:00 horas, reuniu-se, na sala 2B213, Bloco 2B, UFU/Umurama, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelo Presidente: Marcelo Emílio Beletti - ICBIM/UFU - (Presidente e Orientador); Fernanda de Assis Araújo - ICBIM/UFU; Luana Araújo Macedo Scalia - FAMED/UFU; Douglas Eulálio Antunes - SES/DF; Francielle Borges Rosa de Moura - UFCAT (Universidade Federal de Catalão).

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, o Prof. Marcelo Emílio Beletti, apresentou a Comissão Examinadora, e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

APROVADO

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Emílio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/12/2022, às 11:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luana Araújo Macedo Scalia, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/12/2022, às 11:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda de Assis Araujo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/12/2022, às 11:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Francielle Borges Rosa de Moura, Usuário Externo**, em 22/12/2022, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Douglas Eulálio Antunes, Usuário Externo**, em 22/12/2022, às 14:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4116774** e o código CRC **A1631968**.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de concluir mais uma etapa importante em minha carreira.

À minha família e amigos pelo incentivo e apoio em toda minha trajetória.

Ao professor Belleti pelo apoio em momentos de crise.

Aos amigos e colegas Bruno, Jéssica Regina, Lucas Ian, Matheus, Roberta, Cláudia, Ludmila e Paula por tornarem mais fácil este desafio, me auxiliando em todo tempo. Sem vocês não chegaria até aqui.

À minha co-orientadora e amiga Natássia, pela paciência, atenção e parceria. Sem seu apoio não conseguiria superar tantas batalhas.

Em especial, dedico esta pesquisa ao meu querido mestre Dr. Luiz Ricardo Goulart, que sempre me acolheu e inspirou. Jamais me esquecerei do seu carinho e confiança em mim. Seu otimismo e alegria continuam me guiando nesta árdua jornada chamada “doutorado”.

Graças a Deus, chegamos ao fim!

“Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.” (Rm. 11:36)

Jéssica Peixoto Rodrigues

Resumo

O desenvolvimento de coberturas de feridas a partir de biomateriais tem sido alvo de pesquisas devido às suas características estruturais e funcionais únicas. Hidrogéis de origem animal, como os de colágeno e quitosana, atuam como materiais promissores para aplicações em lesões e feridas crônicas, funcionando como agente reparador. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos *in vitro* de *scaffolds* derivados de biomateriais ricos em colágeno, com diferentes formulações contendo bioativos como quitosana, NAC e ϵ -PL. Um biomaterial rico em colágeno previamente descelularizado foi utilizado para fabricar um *scaffold* feito de um hidrogel de colágeno (pré-gel) bioconjugado com quitosana por reticulação e adição de N-acetilcisteína (NAC) e ϵ -poli-lisina (ϵ -PL). A viabilidade celular foi verificada por ensaios de resazurina e *live/dead*, a ultraestrutura dos biomateriais foi avaliada por MEV e FTIR. A sensibilidade antimicrobiana foi avaliada por antibiograma. Já o potencial cicatrizante do biomaterial foi avaliado *in vivo*, em modelo de cicatrização de feridas excisionais em camundongos. No 7º dia após a lesão, as feridas e a pele do seu entorno foram coletadas, pesadas e processadas para avaliação de parâmetros bioquímicos e histológicos, associados ao processo inflamatório e angiogênico. Os resultados mostraram maior viabilidade celular quando a quitosana foi reticulada ao pré-gel, enquanto o colágeno comercial manteve sua citocompatibilidade sem quitosana. Houve aumento da porosidade após a reticulação, o que foi verificado por ligação covalente no estiramento das bandas de colágeno e uma ação antimicrobiana foi observada pela formação de um halo em *scaffolds* contendo NAC e ϵ -PL. Os *scaffolds* de pré-gel bioconjugados com quitosana e NAC/ ϵ -PL apresentaram melhora na cicatrização tecidual, com redução do tamanho da lesão, redução da inflamação e aumento da vascularização. Conclui-se que os *scaffolds* de colágeno/pré-gel reticulado com quitosana-NAC- ϵ -PL têm as características desejáveis para reparo tecidual a baixo custo e são biomateriais promissores no uso da medicina regenerativa.

Palavras-chave: feridas, cicatrização, bioconjugação, colágeno, quitosana, NAC, ϵ -PL.

Abstract

The development of dressings from biomaterials has been the subject of research due to their unique characteristics and capabilities. Animal origin hydrogels, such as collagen and chitosan, operate as promising materials for applications in injuries and chronic wounds, functioning as a repairing agent. The aim of this study is to evaluate the in vitro effects of scaffolds derived from collagen-rich biomaterials, with different formulations containing bioactives such as chitosan, NAC and ϵ -PL. A previously decellularized collagen-rich biomaterial was used to manufacture a scaffold made from a collagen hydrogel bioconjugated with chitosan by cross-linking using EDC/NHS and addition of NAC and ϵ -PL. Cell viability was verified by resazurin and live/dead assays, the ultrastructure of biomaterials was evaluated by SEM and FTIR. Antimicrobial sensitivity was assessed by antibiogram. The healing potential of the biomaterial was evaluated in vivo, in a model of healing of excisional wounds in mice. On the 7th day after the injury, the wounds and surrounding skin were collected, weighed and processed for evaluation of biochemical and histological parameters associated with inflammatory and angiogenic processes. The results showed higher cell viability when chitosan was cross-linked to the pre-gel, while commercial collagen maintained its cytocompatibility without chitosan. There was an increase in porosity after crosslinking, which was verified by covalent bonding in the stretching of the collagen bands and an antimicrobial action was observed by the formation of a halo in scaffolds containing NAC and ϵ -PL. Pre-gel scaffolds bioconjugated with chitosan and NAC/ ϵ -PL improved tissue healing, with reduced lesion size, reduced inflammation and increased vascularity. It is concluded that collagen/pre-gel scaffolds cross-linked with chitosan-NAC- ϵ -PL have desirable characteristics for low-cost tissue repair and are promising biomaterials in the use of regenerative medicine.

Keywords: wound, healing, crosslinking, collagen, chitosan, NAC, ϵ -PL.

LISTA DE FIGURAS

	Legenda	Pag.
Figura 1	Modelo experimental de feridas exsisionais com uso do anel de EVA antes (A) e após (B) o tratamento com scaffolds de colágeno.	31
Figura 2	Esquema representativo da preparação de scaffolds formulados e amostra real de cada material testado (soluções de 1 mg/mL). (A) PQ (B) PQNE (C) CQ (D) CQNE.	35
Figura 3	Viabilidade celular de extratos de scaffolds. (A) scaffolds de solução de 1 mg/mL (B) scaffolds de solução de 1,5 mg/mL (C) scaffolds de solução de 2 mg/mL (D) scaffolds de solução de 3 mg/mL. Controles: células não tratadas, tratadas com 5% de DMSO. Os valores do eixo X representam concentrações em mg/mL. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. Teste <i>One-way ANOVA</i> com comparações múltiplas e pós-teste de <i>Dunnet</i> foram utilizados. Os dados foram considerados significativos quando o valor de p foi menor que 0,05.	36
Figura 4	Ensaio de live/dead com extratos de scaffolds de solução de 1 mg/mL. As colorações com calceína AM e sobreposição de IP foi usada para todas as imagens. Controle: células não tratadas. Controle positivo: células tratadas com DMSO a 5%. NE: NAC - e-PL Ampliação 100x. Barra de escala: 100 mm.	38
Figura 5	Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) de scaffolds derivados do biomaterial colagenoso bioconjugado com quitosana e bioativos NAC e e-PL à temperatura ambiente.	39
Figura 6	Morfologia e ultraestrutura de scaffolds porosos. N/E: NAC - e-PL. Ampliação: 800x. Barra de escala: 20 mm.	41
Figura 7	Avaliação do tamanho dos poros antes e após <i>crosslink</i> com quitosana. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao <i>scaffold</i> puro de cada material. Teste <i>One-way ANOVA</i> com comparações múltiplas e pós-teste de <i>Dunnet</i> foram utilizados. Os dados foram considerados significativos quando o valor de P < 0,05.	42
Figura 8	Efeito antibacteriano de scaffolds contendo NAC - e-PL. (A) <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (B) <i>Acinetobacter baumani</i> (C) <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase. Os círculos indicam a formação do halo. G: Gentamicina; PBS: Tampão Fosfato Salino; C: Colágeno; CNE: Colágeno - NAC - e-PL; CQ: Colágeno - Quitosana; CQNE: Colágeno - Quitosana - NAC - e-PL; P: pré-gel; PNE: Pré-Gel - NAC - e-PL; PQ: Pré-Gel - Quitosana; PQNE: Pré-Gel - Quitosana - NAC - e-PL; Q: Quitosana; QNE Quitosana - NAC - e-PL.	43
Figura 9	Fechamento da ferida nos dias 0, 1, 3 e 7. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Teste <i>One-way ANOVA</i> com comparações múltiplas e pós-teste de <i>Dunnet</i> foram utilizados. Os dados foram considerados significativos quando o valor de P < 0,05.	45
Figura 10	Imagens representativas do fechamento da ferida nos dias 0 (antes de colocar o <i>scaffold</i>), 3 e 7.	47
Figura 11	Imagens representativas do infiltrado inflamatório das feridas e epitelização. Aumento de 20x utilizando o software ImageScope.	49
Figura 12	Quantificação da atividade de NAG. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Teste <i>One-way ANOVA</i> com comparações múltiplas e pós-teste de <i>Dunnet</i> foram utilizados. Os dados foram considerados significativos quando o valor de p foi menor que 0,05.	50
Figura 13	Quantificação da enzima mieloperoxidase. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Teste <i>One-way ANOVA</i> com comparações múltiplas e pós-teste de <i>Dunnet</i> foram utilizados. Os dados foram considerados significativos quando o valor de p foi menor que 0,05.	51
Figura 14	Efeito dos scaffolds na angiogênese no processo de cicatrização. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Teste <i>One-way ANOVA</i> com comparações múltiplas e pós-teste de <i>Dunnet</i> foram utilizados. Os dados foram considerados significativos quando o valor de p foi menor que 0,05.	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Reparo tecidual	9
1.2. Tratamento de feridas	14
1.3. Biomateriais	15
1.3.1. Colágeno	16
1.3.2. Quitosana	18
1.4. Bioativos	20
1.4.1. ϵ -Poli-L-lisina (ϵ -PL)	20
1.4.2. N-acetilcisteína	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo Geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Aspectos Éticos	24
3.2. Obtenção do biomaterial colagenoso descelularizado	24
3.3. Preparo de pré-gel a partir da solubilização do biomaterial descelularizado	25
3.4. Quantificação de Hidroxiprolina	25
3.5. Preparação de <i>scaffolds</i> compostos à base de colágeno com diferentes concentrações	26
3.6. Ensaio de viabilidade celular	27
3.7. Ensaio de <i>live/dead</i>	27
3.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	28
3.9. Análise FT-IR	28
3.10. Ensaio bacteriológico	28
3.11. Testes <i>in vivo</i> em modelo experimental	29
3.12. Análise histológica	31
3.13. Atividade de enzimas pró-inflamatórias (MPO e NAG)	32
3.14. Análise da vascularização	33
3.15. Análise estatística	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Desenvolvimento e caracterização dos <i>scaffolds</i>	34
4.2. Efeito do extrato de <i>scaffolds</i> na viabilidade da célula HaCaT	36
4.2. Avaliação da viabilidade celular por <i>live/dead</i>	37
4.3. Avaliação da bioconjugação de colágeno e quitosana	39
4.4. Avaliação da ultraestrutura e porosidade do <i>Scaffold</i>	40
4.5. Ação antimicrobiana	42
4.6. Análise do fechamento da ferida	43
4.7. Avaliação do infiltrado inflamatório e epitelização	47
4.8. Avaliação da atividade das enzimas pró-inflamatórias (MPO e NAG)	49
4.9. Vascularização	51
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

A pele é a principal barreira de proteção do corpo humano ao meio ambiente. Como o maior órgão do corpo, a pele é nossa primeira linha de defesa, uma vez que a mesma atua como uma barreira à entrada de microrganismos, infecções e lesões, sendo também crucial para a regulação da temperatura e suas capacidades sensoriais nos ajudam a interagir com o meio ambiente (REINKE; SORG, 2012).

Toda ruptura tecidual da estrutura anatômica normal com perda consecutiva de função pode ser descrita como uma ferida. Em casos de ruptura da pele é necessário promover o rápido fechamento da ferida e o reparo da pele danificada para restaurar a função de barreira. Embora a maioria das lesões de pele não seja fatal, elas são uma das principais causas de incapacidade e comprometem a qualidade de vida dos indivíduos (GRAVITZ, 2018).

A pele lesionada necessita ser prontamente restaurada para evitar complicações e danos permanentes e incapacitantes. O processo de cicatrização envolve mecanismos celulares e moleculares que buscam reestabelecer a homeostasia do órgão (BALSA; CULP, 2015). A desregulação de algum desses mecanismos pode levar ao surgimento de irregularidades no processo de reparo da pele levando à cronicidade da lesão (IZADI; GANCHI, 2005).

As feridas crônicas são um problema de saúde pública com repercussão negativa na qualidade de vida dos pacientes, ocasionando sofrimento físico e mental e prejuízo financeiro para os sistemas de saúde, que precisam arcar com os custos elevados das internações prolongadas e tratamentos de longa duração (SEN *et al.*, 2009; POWERS *et al.*, 2016). A carga de custos é atribuída principalmente às amputações de pacientes que relatam baixa qualidade de vida relacionada à saúde e a condição impõe um ônus econômico substancial relacionado ao absenteísmo no trabalho e invalidez (OLSSON *et al.*, 2019).

Lesões crônicas podem estar associadas a persistência da inflamação, alterações vasculares, diabetes, fatores mecânicos, entre outras causas. Estima-se que 10% das pessoas com diabetes terão uma úlcera de pé diabético em algum momento de suas vidas, sendo essa a causa mais comum de amputação não traumática de membros. As úlceras venosas de perna são uma manifestação clínica grave de insuficiência venosa crônica e são responsáveis por cerca de 70% das

úlceras crônicas de membros inferiores. As úlceras por pressão levam os pacientes a apresentar um padrão repetido de ulceração, cicatrização e recorrência. Na Europa a prevalência de úlceras por pressão em internações foi de 10,8%, com resultados variando de 4,6% a 27,2% entre os países. O custo total com tratamento de feridas crônicas representa 2% do gasto total com saúde do governo na Austrália, 2–3% na Inglaterra, 2% do orçamento de saúde europeu (GRAVES; PHILLIPS; HARDING, 2021).

O desenvolvimento e a implementação de estratégias de tratamento de feridas que se concentrem em aumentar a qualidade de vida relacionada à saúde e reduzir efetivamente os custos são urgentemente necessários (MUSTOE, 2006; SEN *et al.*, 2009). Para tal, a otimização dos orçamentos no tratamento de feridas é crucial para que as eficiências da economia de saúde local sejam alcançadas (CARMICHAEL, HUGHES; STYCHE, 2021).

Além disso, a preparação eficaz do leito da ferida é essencial para promover a cicatrização eficaz e prevenir a cronicidade da mesma. Para isso, é necessário avaliar a condição do tecido, a presença de bactérias e biofilmes, os níveis de umidade e a condição das bordas da ferida (POWERS *et al.*, 2016; AZEVEDO, LISBOA & RODRIGUES, 2020). Ferramentas terapêuticas como o desbridamento, controle de infecção hospitalar, controle de exsudato e proteção de bordas de feridas devem ser consideradas na escolha da cobertura ideal para o curativo (ATKIN, 2019). A cobertura ideal fornece suprimento adequado de oxigênio, umidade, angiogênese e nutrição, além de proteger contra patógenos e traumas (SORG, 2017). Objetivos claros das intervenções e reavaliação constante da lesão ajudam a orientar a escolha do produto correto para o tratamento, evitando prejuízos à saúde do paciente e desperdício de recursos materiais (SEM *et al.*, 2009; ATKIN, 2019). Uma abordagem multimodal pode ser necessária para algumas feridas crônicas, sendo necessárias colaborações transdisciplinares entre médicos e cientistas para melhorar as taxas de cicatrização de feridas (AZEVEDO, LISBOA & RODRIGUES, 2020).

Com o aumento da incidência de feridas crônicas relacionadas ao envelhecimento populacional e comorbidades associadas (POWERS *et al.*, 2016), as pesquisas de novos alvos para o desenvolvimento de medicamentos e coberturas cresceram nos últimos anos. Visando acelerar a cicatrização de feridas a baixo custo, a medicina regenerativa tem buscado o uso de materiais biológicos e novas formas

de *drug delivery* para desenvolver produtos que possam acelerar a recuperação tecidual por meio da liberação de citocinas, fatores de crescimento e outros bioativos, além de mimetizar parcialmente a estrutura do tecido lesionado mantendo a biocompatibilidade (AZEVEDO, LISBOA & RODRIGUES, 2020).

1.1. Reparo tecidual

O reparo tecidual se dá através do processo de cicatrização da lesão, que geralmente é caracterizado por quatro fases que se sobrepõem: hemostase (0 a várias horas após a lesão), inflamação (1 a 3 dias), proliferação (4 a 21 dias) e remodelação (21 dias a 1 ano) (REINKE; SORG 2012).

1.1.1 Hemostasia e inflamação

A primeira etapa da cicatrização fisiológica inicia-se com a hemostasia e formação de uma matriz extracelular (MEC) imediatamente após a lesão. Essa fase também é descrita como a “fase *lag*”, na qual o organismo precisa gerenciar o recrutamento de muitas células e fatores para o processo de cicatrização da ferida (REINKE; SORG, 2012). Diferentes cascatas de coagulação são iniciadas e os trombócitos são ativados para agregação. Os vasos lesionados iniciam a vasoconstrição desencadeada pelas plaquetas entre 5 a 10 minutos reduzindo a perda de sangue formando um coágulo sanguíneo composto por citocinas, fatores de crescimento, fibrina, fibronectina, vitronectina e trombospondinas, formando uma matriz provisória para a migração celular de leucócitos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais (ZHAO *et al.*, 2016, KIMURA; TSUJI, 2021).

A vasoconstrição e a formação de coágulos ocasionam uma falha de perfusão local reduzindo o fluxo sanguíneo e a oferta de oxigênio, aumentando a glicólise e alterações de pH. A vasoconstrição é seguida por uma vasodilatação na qual trombócitos invadem a matriz provisória da ferida. As plaquetas liberam fatores quimiotáticos que resultam na infiltração de leucócitos. Tanto plaquetas quanto leucócitos liberam interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6), o fator de necrose tumoral (TNF- α), fator básico de crescimento de fibroblastos (FGF-2), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), fator de transformação do crescimento (TGF- α e TGF-

β), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF-A), fator de crescimento epitelial (EGF), dando início ao processo inflamatório, a angiogênese, a síntese de colágeno e a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (REINKE; SORG, 2012; HAN; CEILLEY, 2017; LIU *et al.*, 2020).

Nesta etapa começa a fase inflamatória que pode ser dividida em uma fase inicial com recrutamento de neutrófilos e uma fase tardia com o aparecimento e transformação de monócitos. Devido à resposta da via do complemento ativado, plaquetas degranuladas e subprodutos da degradação da flora bacteriana da pele, os neutrófilos são recrutados para o local da lesão cutânea e estão presentes por 2 a 5 dias, podendo variar em caso de contaminação de microorganismos patogênicos. (MUSTOE; O'SHAUGHNESSY; KLOETERS, 2006; SEN *et al.*, 2009; REINKE; SORG, 2012;)

Os neutrófilos liberam mediadores como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), que amplificam a resposta inflamatória e estimulam o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a interleucina-8 (IL-8) para uma adequada resposta de reparo. Além disso, iniciam seu desbridamento liberando substâncias antimicrobianas altamente ativas e proteinases. O trabalho dos neutrófilos é crucial nos primeiros dias após a lesão, porque sua capacidade de fagocitose e secreção de protease mata as bactérias locais e ajuda a degradar o tecido necrótico (REINKE; SORG, 2012; ZHAO *et al.*, 2016; KIMURA; TSUJI, 2021)

Os macrófagos atuam na defesa do hospedeiro, promoção e resolução da inflamação, remoção de células apoptóticas e na proliferação celular e restauração do tecido após a lesão. Aproximadamente 3 dias após a lesão, os macrófagos M1 são recrutados e iniciam o processo de fagocitose de patógenos e restos celulares, ativando a secreção de fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), induzindo a proliferação e migração dos fibroblastos. Conforme ocorre a formação do tecido de granulação, os macrófagos se diferenciam em M2 promovendo a transição para um estado fenotipicamente anti-inflamatório ativando citocinas anti-inflamatórias como IL-10. Os macrófagos M2 induzem a diferenciação dos miofibroblastos ativando o TGF- β que desempenha um papel fundamental no controle da cicatrização de feridas. Alterações nesta função resultam no acúmulo e contração da MEC culminando na cicatrização patológica de

feridas (REINKE; SORG, 2012; BALSA; CULP, 2015; ZHAO *et al.*, 2016, KIMURA; TSUJI, 2021).

1.1.2 Fase de proliferação e remodelação

Na fase de proliferação (aproximadamente 3-10 dias) inicia-se a cobertura da superfície da ferida, com a formação do tecido de granulação e a revascularização através da angiogênese (REINKE & SORG, 2012). A restauração do sistema vascular da pele é então iniciada por fatores de crescimento VEGF, PDGF, bFGF e a serina protease trombina que se ligam aos seus receptores em células endoteliais de vasos existentes e ativam cascatas de sinalização para a secreção de enzimas proteolíticas que desintegram a membrana basal, ocasionando a proliferação e migração de células endoteliais para a ferida. As células endoteliais orientam-se em moléculas de adesão superficiais conhecidas como integrinas ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha5\beta1$), liberando metaloproteinases e a lise do tecido endotelial circundante (MUSTOE; O'SHAUGHNESSY; KLOETERS, 2006; REINKE; SORG, 2012; BALSA; CULP, 2015).

A liberação de citocinas reguladoras como IFN- γ e TGF- β pelos fibroblastos, promovem a síntese de colágeno, fibronectina e outras substâncias que são a base para a formação de uma nova matriz de tecido conjuntivo importante no fechamento e restauração da resistência mecânica da ferida. Conforme a síntese de colágeno aumenta, a proliferação de fibroblastos diminui sucessivamente até atingir o equilíbrio entre síntese e degradação da MEC (REINKE; SORG, 2012; KIMURA; TSUJI, 2021).

O processo de reepitelização é ativado por células epiteliais e não epiteliais nas bordas da ferida em direção ao centro da lesão, liberando diferentes citocinas e fatores de crescimento como EGF, KGF, IGF-1 e NGF. A última etapa da fase de proliferação é o desenvolvimento do tecido de granulação, dando início a fase de remodelamento. Como tecido de transição, este substitui a matriz provisória e pode produzir uma cicatriz por remodelamento tecidual (XUE; JACKSON, 2015). O tecido de granulação é caracterizado por uma alta densidade de fibroblastos, granulócitos, macrófagos, capilares sanguíneos e feixes de colágeno frouxamente organizados, sendo altamente vascularizado, característico de lesões típicas com boa cicatrização (IZADI; GANCHI, 2005; REINKE; SORG, 2012).

A remodelação é a última fase da cicatrização da ferida e ocorre a partir do dia 21 até 1 ano após a lesão que inicia-se com a reepitelização que substitui o tecido de granulação, tornando-se avascular e acelular. Durante a maturação da ferida, o colágeno tipo III é então substituído pelo colágeno tipo I, mais resistente (IZADI & GANCHI, 2005; REINKE; SORG, 2012; XUE; JACKSON, 2015).

1.1.3 Feridas crônicas

A inviabilização de qualquer uma dessas etapas resulta em comprometimento da cicatrização, como por exemplo no caso de úlceras crônicas de difícil cicatrização devido a condições inapropriadas de tratamento, incessantes estímulos de inflamação ou por influência de outras comorbidades, resultando em um processo doloroso e longo que apresenta sobrecarga de saúde e econômica importante para a sociedade (IZADI; GANCHI, 2005; MUSTOE; O'SHAUGHNESSY; KLOETERS, 2006; SEN *et al.*, 2009).

A transição da fase inflamatória para a proliferativa é um passo fundamental durante a cicatrização de feridas e deve ser estimulada e promovida através dos diversos procedimentos de estomaterapia (BOATENG; CATANZANO, 2015). No entanto, a inflamação prolongada, causada por fatores intrínsecos ou extrínsecos ao indivíduo, é prejudicial e pode resultar em diferenciação e ativação desregulada dos queratinócitos, impedindo o progresso nos estágios normais da cicatrização de feridas. A inflamação grave também tem sido associada a cicatrizes excessivas (XUE; JACKSON, 2015; IZADI; GANCHI, 2005).

Existem muitos fatores que prejudicam o processo de cicatrização e retardam ou alteram a sequência normal da cicatrização de feridas. Esses fatores são geralmente classificados como intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos incluem isquemia, infecção, presença de tecido necrótico e corpos estranhos na ferida. Os fatores extrínsecos incluem diabetes mellitus, câncer, doença crônica, uso de esteroides, lesão por radiação e desnutrição. A combinação desses fatores desempenha um papel importante na ferida crônica (IZADI; GANCHI, 2005).

As feridas crônicas não seguem uma cascata tão bem definida, sendo lesões que permanecem em estado inflamatório prolongado e não progridem para a fase de proliferação. Fatores como hipóxia tecidual local, trauma repetitivo (pressão

mecânica) e alta carga bacteriana, associados a respostas celulares e sistêmicas prejudicadas do organismo, perpetuam um ciclo deletério que impedem a progressão da cicatrização (XUE; JACKSON, 2015). Como tal, a lesão não cicatriza dentro de um período de tempo fisiologicamente apropriado.

A infiltração excessiva de neutrófilos neste ciclo de inflamação crônica atua como um marcador biológico de feridas crônicas. A abundância de neutrófilos leva à superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando danos diretos à MEC, membrana celular e senescência celular prematura (SORG *et al.*, 2017). Os neutrófilos abundantes, liberam proteases como elastase e metaloproteinases (MPs), como colagenase de neutrófilos (MP-8). A elastase degrada fatores de crescimento como PDGF e TGF- β , e a colagenase degrada e inativa componentes da MEC reduzindo sua biodisponibilidade. Tanto os neutrófilos quanto os macrófagos ativados também produzem citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , que aumentam a produção de MPs e reduzem os inibidores teciduais de MPs (TIMPs). Esse desequilíbrio resulta na degradação da MEC, prejudicando a migração celular e reduzindo a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno que são essenciais para cicatrização da lesão (TAKEO; LEE; ITO, 2015; LANDEN; LI; STAHL, 2016). Além disso, os produtos de degradação da MEC aumentam o processo inflamatório em um ciclo deletério combinado à resposta sistêmica prejudicada. O desbridamento torna-se necessário para romper com o ciclo de degradação da ferida crônica (XUE; JACKSON, 2015; ZHAO *et al.*, 2016). Um fator importante na cronificação de feridas são os microrganismos que afetam a cicatrização de feridas. Além de danos diretos ao hospedeiro, as bactérias atraem leucócitos com resultante amplificação de citocinas inflamatórias, proteases e ROS, iniciando e mantendo as cascatas inflamatórias que degradam a MEC interrompendo a migração celular e inibindo o fechamento da ferida. Estes efeitos ocorrem devido à liberação de enzimas líticas, exotoxinas e endotoxinas e efeitos antifagocitários, os quais levam à deterioração da cicatrização de feridas (DAESCHLEIN, 2013).

As bactérias que colonizam feridas crônicas geralmente formam biofilmes ao contrário das bactérias colonizadoras de feridas agudas. Na formação de biofilmes em feridas, as bactérias são incorporadas em uma matriz polimérica secretada, que fornece um ambiente ideal de proteção e escape da resposta imune do hospedeiro e da ação de antibióticos. As bactérias comumente identificadas em feridas crônicas

incluem organismos comensais e patogênicos, como bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* e vários microrganismos anaeróbios, variando conforme a etiologia da ferida, localização, estado do paciente e antibiótico em uso (ZHAO *et al.*, 2016).

Após considerados todos estes aspectos, pode-se dizer que o objetivo final do tratamento de feridas crônicas é o término da inflamação, removendo os fatores que podem causá-la e perpetuá-la, promovendo o processo de cicatrização fisiológico da ferida aguda. Assim, coberturas e dispositivos que promovam essa propriedade continuam sendo a base do tratamento de feridas e alvo de pesquisas científicas.

1.2. Tratamento de feridas

Desde a década de 1960, o curativo de feridas é considerado um fator positivo na cicatrização e a estomaterapia é um processo em constante desenvolvimento. A cobertura adequada deve promover e manter um ambiente propício ao reparo de feridas, que se caracteriza em um ambiente úmido com troca gasosa adequada, isolamento térmico e a ausência de contaminação. Além disso, as coberturas utilizadas para o curativo devem proteger contra infecções secundárias, induzir a regeneração do tecido ou evitar o aumento da lesão, aliviar a dor da ferida e promover a qualidade da cicatrização (ZHANG *et al.*, 2019).

As feridas podem ser classificadas em 4 tipos, conforme etiologia e aspecto: Classe I: Limpo - Ferida cirúrgica na qual nenhuma inflamação é encontrada e os tratos respiratório, alimentar, genital ou urinário não são penetrados. Na maioria das vezes, fechado primariamente, com ou sem drenagem; Classe II: Limpo-contaminado - Ferida cirúrgica na qual os tratos respiratório, alimentar, genital ou urinário são penetrados sem contaminação incomum, infecção ou quebra de técnica estéril; Classe III: Contaminado - Feridas abertas, frescas e acidentais. Ferida cirúrgica com grandes quebras nas técnicas estéreis. Derramamento grosseiro do trato gastrointestinal. Incisões com inflamação aguda não purulenta; Classe IV: Infectado sujo - Feridas traumáticas antigas com tecido desvitalizado com ou sem infecção existente ou vísceras perfuradas (BALSA; CULP, 2015).

Para seleção da cobertura a ser utilizada é fundamental realizar uma boa avaliação clínica da ferida, objetivando atingir as metas de manejo de curativo. O

tratamento de feridas crônicas é mais complexo e requer cuidados específicos como manter a umidade do leito da ferida, evitar atrito e pressão sobre a lesão, prevenir ou resolver os processos infecciosos (JONES; FOSTER; LONGAKER, 2018).

A umidade promove um ambiente livre de formação de crostas e abundante em células de defesa, além de facilitar a re-epitelização através do desbridamento autolítico de tecido necrótico por meio de enzimas endógenas. O fluido da ferida também contém citocinas e fatores de crescimento que estimulam a fibroplasia e a epitelização, podendo também conter antibióticos de circulação sistêmica (BALSA; CULP, 2015).

As estratégias antimicrobianas consistem na redução da carga microbiana para permitir que a resposta imunológica seja regulada e o processo inflamatório crônico seja controlado. Assim, o estado de saúde geral bem como a nutrição colaboram com a manutenção do processo de cicatrização saudável (HAN; CEILLEY, 2017). Deve-se considerar a presença de bactérias e formação de biofilmes multiresistentes no contexto dos serviços de saúde e internações prolongadas. Os antimicrobianos tópicos são mais indicados para feridas superficialmente infectadas, evitando o desenvolvimento de resistência com tratamentos sistêmicos (EVELHOCH, 2020). No entanto, pode ocorrer resistência bacteriana a agentes tópicos, bem como dermatite alérgica de contato em feridas crônicas. Neste contexto, estratégias para antissepsia e tratamento antimicrobiano são alvos de pesquisas no desenvolvimento de novas tecnologias da medicina regenerativa (DAESCHLEIN, 2013).

O cuidado eficaz para feridas crônicas requer uma abordagem multimodal, incluindo otimização do leito da ferida, gerenciamento de condições médicas crônicas e acompanhamento consistente. A relação custo-benefício é uma consideração importante, dada a despesa de coberturas avançadas (JONES; FOSTER; LONGAKER, 2018). Nas últimas décadas, as técnicas de bioengenharia são uma alternativa viável às coberturas tradicionais para feridas venosas e diabéticas de difícil cicatrização. Essas coberturas usam componentes da pele humana ou animal para imitar a arquitetura da pele normal, otimizando o ambiente de cicatrização e substituindo o tecido lesionado, fornecendo assim suporte estrutural e mantendo a umidade em condições miméticas (POWERS, *et al.*, 2016).

1.3. Biomateriais

1.3.1. Colágeno

Muitos produtos para tratamento de feridas foram criados e desenvolvidos nas últimas décadas com o objetivo de promover a cicatrização e melhorar a qualidade de vida dos pacientes atingidos por feridas na pele (GIL *et al.*, 2013; CHATTOPADHYAY; RAINES, 2014; GARG, RATH; GOYAL, 2015; XU *et al.*, 2015; DAS; BAKER, 2016). A utilização de materiais biocompatíveis e não imunogênicos apresenta-se como uma nova alternativa ao tratamento de feridas crônicas, sendo um dos campos mais explorados pela medicina regenerativa com o objetivo de aperfeiçoar o processo de cicatrização e reduzir o risco de infecções e outras comorbidades (SORG *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de coberturas para feridas a partir do colágeno tem sido alvo de pesquisas devido à suas características estruturais e funcionais únicas, tais como alta afinidade com a água, propriedade quimiotática, capacidade de absorção, ativação plaquetária e biocompatibilidade. Além disso, o colágeno também pode ser combinado com outros materiais e aditivos para obter efeitos sinérgicos, potencializando seu papel terapêutico no tratamento de feridas crônicas ou infectadas. Hidrogéis de origem animal, como os feitos de colágeno e quitosana, atuam como materiais promissores para aplicações em lesões e feridas crônicas, funcionando como agente reparador que transporta as células da pele do próprio paciente para uma matriz compatível e organizada. Coberturas e matrizes à base de hidrogel têm o potencial de satisfazer todos os requisitos de uma cobertura ideal, pois fornecem um ambiente consistente e propício para a cicatrização de feridas com aparência cosmética aceitável (PURNA; BABU, 2000; CHATTOPADHYAY; RAINES, 2014).

Os colágenos são as proteínas mais abundantes nos mamíferos classificadas em 29 tipos que desempenham papéis estruturais na formação dos tecidos, sendo depositadas na MEC e contribuem para as propriedades mecânicas e organização tecidual. Eles interagem com as células através de receptores e regulam sua proliferação, migração e diferenciação. O colágeno é formado por um conjunto de glicoproteínas que são caracterizadas pela sequência de aminoácidos [Gly-X-Y]_n, na qual as posições X e Y são ocupadas pela prolina e hidroxiprolina respectivamente, formando a tripla hélice a partir de três hélices α de poliprolina II (SORUSHANOVA *et al.*, 2019). A hidroxiprolina é o aminoácido característico do colágeno, derivado da atividade catalítica da prolyl 4-hidroxilase e representa aproximadamente 10% da

composição do mesmo. A hidroxiprolina é considerada a “impressão digital” do colágeno e confere estabilidade térmica corporal. Fragmentos bioativos liberados pela clivagem proteolítica de colágenos regulam uma série de processos fisiológicos e patológicos, como desenvolvimento, angiogênese, crescimento tumoral e metástase, e reparo tecidual (RICARD-BLUM, 2011).

O colágeno pode ser considerado como uma cola biológica que mantém as células da MEC, por ser a principal molécula que a constitui. A MEC é formada por fibrilas estriadas que dão suporte para o crescimento celular e oferecem resiliência mecânica aos tecidos conjuntivos. O colágeno desempenha papel fundamental na manutenção da integridade estrutural dos tecidos conjuntivos, e pode ser considerado um importante biomaterial que mimetiza propriedades do tecido íntegro composto de colágeno (PURNA & BABU, 2000). A prevalência de colágeno em tecidos humanos e várias propriedades inerentes como a capacidade de formar *scaffolds* de várias conformações físicas com propriedades mecânicas controláveis e biodegradabilidade, o torna uma escolha natural como matéria-prima para engenharia de tecidos (SORUSHANOVA *et al.*, 2019). O colágeno é a proteína de matriz extracelular mais antiga e abundante e oferece oportunidades significativas como biomaterial de escolha para tratamentos de lesões (PURNA; BABU, 2000; RICHARD-BLUM, 2011).

Dada a baixa disponibilidade de autoenxertos, tecidos xenogênicos derivados de submucosa do intestino delgado, bexiga, pericárdio, músculo esquelético, válvula cardíaca, tendão e ligamentos são amplamente utilizados na clínica (SORUSHANOVA *et al.*, 2019). Diferentes métodos são usados para isolar e purificar diferentes tipos e quantidades de colágeno de vários tecidos ou desnaturar o colágeno em gelatina que contém hélices triplas quebradas simples. Soluções ácidas diluídas são ineficazes contra ligações cruzadas mais estáveis, sendo indicado o uso de enzimas proteolíticas (principalmente pepsina). Porém, as células, DNA e outras moléculas imunogênicas devem ser removidas através da descclularização por métodos químicos, biológicos ou físicos, o que pode ocorrer com diferentes graus de eficiência. Independente da origem, o colágeno possui malha fibrilar covalentemente reticulada. No entanto, a reticulação natural do colágeno mediada pela lisil oxidase não ocorre *in vitro*, assim, os biomateriais de colágeno reconstituídos não apresentam resistência e podem se desintegrar ou colapsar mediante os tecidos circundantes *in vivo*. Caso deseje-se que este material tenha uma taxa de incorporação pelo

organismo menos acelerada, torna-se necessária a reticulação de colágeno exógeno para o uso em tratamentos de regeneração tecidual, utilizando combinações com outros biomateriais ou reagentes químicos que formam ligações covalentes com as moléculas de colágeno. Os *scaffolds* de colágeno podem ser fabricados usando a técnica de liofilização, controlando a porosidade através do congelamento e formação de cristais de gelo que varia em tamanho conforme o ajuste da taxa de congelamento (SORUSHANOVA *et al.*, 2019).

O biomaterial utilizado neste estudo (cujo processo de produção está em pedido de depósito de patente) foi caracterizado quanto à sua constituição e morfologia, apresentando altos níveis de colágeno, demonstrando promissora aplicação na medicina regenerativa. Este mesmo material foi implantado na região subcutânea de ratos Wistar para avaliação de biocompatibilidade entre espécies (biomaterial de origem suína) e não apresentou rejeição, processo infeccioso ou reação de corpo estranho, mostrando interação com o tecido adjacente e provável início de remodelamento nos tempos de 5 e 15 dias (BARBOSA, 2020).

De acordo com Barbosa (2020), a presença do material em si, em roedores, parece não causar mal-estar e nem dano doloroso a esses animais, já que não foi observada nenhum tipo de alteração comportamental do mesmo, como aquelas associadas à dor (posição anti-álgica, hiperalgesia local, letargia, etc), uma vez que os animais foram avaliados diariamente quanto à presença de sinais estressores e vigilância quanto a dor e pontos finais humanitários.

1.3.2. Quitosana

A quitosana, um polissacarídeo natural, catiônico e biodegradável, é amplamente utilizada em biomedicamentos com bom desempenho, que pode ser submetido a diversas reações químicas para obtenção de seus derivados com aplicações variadas (PATRULEA *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2018). Uma das aplicações onde os derivados de quitosana mostraram efeito significativo é a cicatrização de feridas. Derivados de quitosana como nanopartículas, microesferas, hidrogéis e micelas possuem propriedades hidrofílicas e são excipientes promissores para *drug delivery*, que age aumentando a estabilidade de drogas de liberação lenta e têm sido amplamente utilizados como materiais antibacterianos de baixa toxicidade (RASHKI

et al., 2021). A quitosana apresenta maior eficiência quando modificada funcionalmente com outros compostos naturais, partículas metálicas antimicrobianas e antibióticos (ORYAN; SAHVIEH, 2017;).

Diversos estudos demonstram o potencial de agente antimicrobiano da quitosana, que é variável conforme o grau de polimerização, o grau de acetilação, o tipo de microrganismo, as condições ambientais e o tipo de derivado. Atua contra bactérias gram-positivas; posto isto, é de interesse na conservação de alimentos e prevenção de biofilmes (WANG, 2020). O mecanismo de ação da quitosana ainda não foi totalmente elucidado, porém algumas hipóteses são consideradas como adsorção eletrostática, inibição do crescimento celular bacteriano por interferência na transcrição do DNA e absorção de nutrientes necessários para o crescimento microbiano (VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017). Mecanicamente, o efeito antibacteriano da quitosana é principalmente associado ao extravazamento de conteúdo intracelular, induzido por mau funcionamento e permeabilidade alterada da membrana celular carregada negativamente, na qual a quitosana é adsorvida (VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017; RASHKI *et al.*, 2021).

No processo de cicatrização a quitosana apresenta propriedades hemostáticas, promove a migração de neutrófilos polimorfonucleares, proliferação de fibroblastos dérmicos, infiltração de neutrófilos e macrófagos, aumenta a expressão de fatores de crescimento favorecendo a formação do tecido de granulação e regula a produção excessiva de colágeno na fase de remodelação (PATRULEA *et al.*, 2015; SHIVAKUMAR *et al.*, 2021). As coberturas de quitosana apresentam reações adversas mínimas, aceleram a cicatrização de feridas quando usado como compósitos em combinação com outros materiais (WANG *et al.*, 2020). Foi demonstrado que a quitosana aumenta a expressão de TGF- β 1 na fase inicial pós-lesão (dia 3), facilitando a regeneração tecidual, porém, reduzindo a fase tardia, evitando a formação de cicatriz (SHIVAKUMAR *et al.*, 2021). Estudos demonstram a eficácia da quitosana como carreador para entrega local de fatores de crescimento de fibroblastos na cicatrização de feridas, bem como antibióticos que inibem efetivamente o crescimento de bactérias (RASHKI *et al.*, 2021).

Em resumo, a quitosana é um biopolímero linear natural composto por uma superfície hidrofílica que promove adesão, proliferação e diferenciação celular, o que lhe confere propriedades como: biocompatibilidade, bioatividade, biodegradabilidade

e alta viabilidade em diferentes formas e estruturas (ORYAN; SAHVIEH, 2017). Além disso, devido aos grupos amino carregados positivamente na estrutura desse carboidrato, ele se torna mucoadesivo, o que promove a capacidade de se ligar às membranas celulares. Não só a quitosana possui porosidade adequada como em alguns estudos foi comprovado que sua combinação com colágeno resultou em melhor desempenho em termos de capacidade regenerativa (ORYAN; SAHVIEH, 2017; KIM *et al.*, 2018)

1.4. Bioativos

1.4.1. ϵ -Poli-L-lisina (ϵ -PL)

ϵ -Poli-L-lisina (ϵ -PL) é um peptídeo catiônico que consiste em 25 a 35 resíduos de L-lisina (DODD *et al.*, 2018). O ϵ -PL foi descoberto como um material extracelular produzido por actinomicetos filamentosos como *Streptomyces albulus* e vem sendo utilizado como um peptídeo antimicrobiano natural que atua inibindo diversos microrganismos como bactérias, leveduras e vírus (LIU, 2017; SHUKLA, 2012; GEORNARAS, 2007). Devido às suas propriedades de biodegradação e biocompatibilidade, o ϵ -PL tem sido amplamente utilizado como conservante de alimentos na indústria (CHHEDA; VERNEKAR 2015).

ϵ -PL apresenta ação inibidora de quatro espécies bacterianas testadas *Xanthomonas citri*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas euvesicatoria*. Esse peptídeo atua no controle de doenças bacterianas, pois tem atividade antimicrobiana significativa (RODRIGUES *et al.*, 2020). Sabe-se que o ϵ -PL é biodegradável, atóxico, resistente à degradação térmica e possui atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de microrganismos (GEORNARAS *et al.*, 2007).

Além disso, grânulos compostos com ϵ -PL apresentaram efeito antimicrobiano contra *E. coli* e *S. aureus*. Os autores demonstraram que o bioativo é biodegradável em 28 dias ao ar livre e apresentou potencial promissor para purificação de água e processamento de alimentos (NIE *et al.*, 2021).

Também foram demonstradas a ação antibacteriana e inibição da formação de biofilmes para *E. coli* e *S. aureus* em implantes ortopédicos e outras aplicações como

bioativo adjuvante no tratamento de infecções agudas (GUO *et al.*, 2021; LAN, *et al.*, 2021)

1.4.2. N-acetilcisteína

A N-acetilcisteína (NAC), variante acetilada do aminoácido L-cisteína, é fonte de grupos sulfidril (SH) e é convertida no organismo em metabólitos capazes de estimular a síntese de glutatona (GSH), promovendo a desintoxicação e atuando diretamente como captadores de radicais livres. NAC tem sido utilizado na prática clínica como agente mucolítico em doenças respiratórias; no entanto, também parece ter efeitos benéficos em condições de estresse oxidativo, como infecção por HIV, câncer, doenças cardíacas e tabagismo (KELLY, 1998). Há um interesse crescente nos efeitos do NAC contra o estresse oxidativo associado às suas propriedades antioxidantes devido à sua rápida reação com os radicais livres e redução da restituição da glutatona como demonstrado por Dhouib *et al.* (2016) e Adil *et al.* (2018).

A droga tem sido usada como adjuvante no manejo de diferentes condições patológicas, como necrólise epidérmica tóxica, distúrbios cutâneos, dermatite de contato, dermatite atópica, melasma, pseudoporfiria, doenças do tecido conjuntivo, cicatrização de feridas e alopecia. Além disso, apresenta ação protetora contra radiação ultravioleta, prevenindo o fotoenvelhecimento e a fotocarcinogênese. No entanto, maiores evidências do seu uso dérmico são necessárias (ADIL; AMIN, 2018). Esta é uma alternativa segura e com baixo custo que apresenta ação antioxidante na cicatrização de feridas, estimulando a proliferação celular, migração e redução de metaloproteinases. Estudos experimentais realizados principalmente em animais relataram que a n-acetilcisteína é eficaz em vários tipos de feridas, como queimaduras, úlceras por pressão, feridas incisionais e feridas após radioterapia (DHOUIB *et al.*, 2016).

Outros estudos sugerem um papel da NAC como potencial adjuvante em tratamento de biofilmes induzidos por bactérias gram-negativas e gram-positivas e leveduras, atuando em combinação com outros antibióticos (DINICOLA *et al.*, 2014). Os mecanismos responsáveis pela atividade antibiofilme da NAC ainda são desconhecidos no manejo de infecções relacionadas ao biofilme. Sugere-se que a

atividade antimicrobiana da NAC pode estar relacionada com a inibição competitiva da utilização de cisteína, a reação do grupo sulfidril com proteínas bacterianas e a perturbação do equilíbrio do metabolismo celular e vias de transdução de sinal intracelular (BLASI, et al., 2016; EROSHENKO et al., 2017).

A ação antioxidante efetiva de NAC permite combater o estresse oxidativo em infecção por *P. aeruginosa*, conforme demonstrado por Guerini *et al.* (2021). Além disso, observou-se a atividade antibiofilme dose-dependente de micropartículas carregadas com NAC (GUERINI et al., 2021). Essa ação também foi favorecida pela carga positiva das micropartículas que permitiram melhor interação com a carga negativa da parede celular das bactérias presentes na matriz do biofilme. Além disso, Costa e colaboradores (2017) confirmaram que NAC evita adesão de *S. aureus* resistente a meticilina.

Estudos biológicos confirmaram que NAC bioconjugada com quitosana evita a adesão de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina prejudicando a formação de biofilme sem induzir efeitos citotóxicos. O efeito antiadesivo observado na formulação deve-se a redução dos grupos amina livres disponíveis na quitosana que promove o aumento da hidrofiliabilidade reduzindo a adesão bacteriana por redução da adsorção protéica (COSTA *et al.*, 2017).

Objetivando o desenvolvimento de um material para cobertura de feridas que contemple os principais alvos de um curativo ideal, buscamos avaliar os efeitos de *scaffolds* derivados de materiais ricos em colágeno em *crosslinking* com quitosana e os bioativos NAC e ϵ -PL, em um modelo pré-clínico de cicatrização de feridas cutâneas excisionais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo desenvolver diferentes formulações de *scaffolds* derivados de materiais colagenosos com bioativos e, posteriormente, caracterizar e avaliar os efeitos destes materiais *in vitro* e em um modelo pré-clínico de cicatrização de feridas cutâneas excisionais mimetizando feridas crônicas.

2.2. Objetivos específicos

- (1) Desenvolver um *scaffold* de colágeno poroso com bioativos para feridas cutâneas.
- (2) Caracterizar as diferentes formulações dos *scaffolds* de colágeno.
- (3) Avaliar os efeitos das diferentes formulações em cultura de células e antibiograma;
- (4) Avaliar o efeito das diferentes formulações na velocidade de fechamento de feridas cutâneas excisionais *in vivo*;
- (5) Avaliar os efeitos dos *scaffolds* sobre a inflamação, a angiogênese e re-epitelização no ensaio de fechamento de feridas cutâneas excisionais *in vivo*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos

A realização dos testes *in vivo* deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA – UFU) sob protocolo de registro 094/19. Todos os experimentos foram conduzidos seguindo as normas recomendadas pelo CEUA/REBIR - UFU.

3.2. Obtenção do biomaterial colagenoso descelularizado

Este trabalho utilizou várias formulações de colágeno provenientes de duas fontes distintas. Uma destas fontes é um colágeno comercial (descrito abaixo) e outra é um biomaterial desenvolvido no Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho. Os detalhes do protocolo para descelularização do biomaterial estão publicados em um pedido de patente, ainda em análise. Resumidamente, foi realizada a limpeza do biomaterial bruto, em seguida, o material foi lavado em água corrente e após com solução salina tamponada (3x), por 10-30 min, à 100-150 rpm e 20-35 °C. Para a lise celular, o material foi mantido *overnight* em um tampão hipotônico sob agitação de 100-150 rpm a 20-35 °C, em seguida, incubado com solução detergente (Tris 10mM/ 0,1% EDTA/ 0,1% SDS) *overnight*. Posteriormente, foi incubado com água destilada por 4 horas nas mesmas condições e temperaturas anteriores. As amostras foram lavadas 2x com solução salina, por 10-30 min, à 200-300 rpm.

Após a etapa de lavagem, o biomaterial foi tratado com nucleases por 3 horas à 100-250 rpm a 25-40° C. Em seguida, foi rapidamente lavado em solução salina com 0,1% do agente inibidor da atividade nuclease e armazenado a -20° C.

Para confirmar a eficiência do processo de descelularização, foram realizadas extrações de DNA com kit comercial, quantificação em espectrofotômetro e avaliação histológica com coloração de hematoxilina e eosina, que confirmou o sucesso da descelularização (resultados não apresentados).

3.3. Preparo de pré-gel a partir da solubilização do biomaterial descelularizado

Após a descelularização, o biomaterial foi liofilizado *overnight* e pesado entre 230-250 mg. Para solubilização foi preparada uma solução de ácido acético 0,5 M à qual foram adicionados 9 mg de pepsina.

O biomaterial foi incubado na solução por 48 horas a 25° C sob agitação. Após a incubação, o pH foi ajustado entre 6,8 - 7,4 mantendo a solução em gelo e armazenado a 4° C.

A solução colagenosa obtida após a solubilização foi denominada pré-gel para fins deste trabalho.

3.4. Quantificação de Hidroxiprolina

Para verificar a composição colagenosa do biomaterial, foi utilizado o método de quantificação de colágeno por hidroxiprolina (Sigma-Aldrich), conforme protocolo do kit comercial. Resumidamente, a amostra de pré-gel foi solubilizada em HCl puro na proporção de 1:1 e incubada em banho seco a 120° C por 24 horas. Em seguida, a amostra foi diluída em água destilada (1:2; 1:4; 1:8). Para realizar a curva padrão, uma solução de 4 µg/mL de hidroxiprolina foi preparada para diluição em série (4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,125 µg/ml, 0,062 µg/ml e branco).

Após a preparação das diluições, 10 µL/poço de cada amostra foram plaqueados (placa de 96 poços) e mantidos a 50° C por 1 hora. Em seguida, 100 µL de Cloramina T (Cloramina T 127mg/ N-propanol 50%/ 10mL tampão acetato citrato pH 6,5) (Sigma-Aldrich) foram adicionados por poço e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Subsequentemente, 100 µL por poço de Reagente de Ehrlich (DMAB 1,5g – Sigma Aldrich/ N-propanol 6,6 mL/ Ácido perclórico 3,3 mL) foram adicionados e mantidos a 60 °C por 90 minutos. A leitura de absorbância foi realizada em 560 nm. Para estimar a quantidade de colágeno no biomaterial, foi utilizada a fórmula abaixo:

$$\text{Colágeno} = \frac{\text{Quantidade de hidroxiprolina na amostra} * 100}{13,5}$$

3.5. Preparação de *scaffolds* compostos à base de colágeno com diferentes concentrações

A quitosana 75% desacetilada (Sigma-Aldrich) foi diluída em ácido acético 0,1M nas concentrações de 1mg/mL, 1,5mg/mL, 2mg/mL e 3mg/mL. Para solubilização, manteve-se sob agitação (400 rpm) *overnight*, em temperatura ambiente. Colágeno comercial tipo I bovino (Sigma-Aldrich) 6 mg/mL foi diluído em HCl 0,01M nas concentrações de 1mg/mL, 1,5 mg/mL, 2 mg/mL e 3 mg/mL. Após a quantificação do colágeno presente no pré-gel, este foi diluído em solução salina fosfatada tamponada (PBS) 1x nas concentrações de 1 mg/mL, 1,5 mg/mL, 2 mg/mL e 3 mg/mL.

Para o desenvolvimento e avaliação do *scaffold*, foram realizadas 7 formulações diferentes nas concentrações de 1mg/mL, 1,5mg/mL, 2mg/mL e 3mg/mL para comparação: Colágeno - NAC - ϵ -PL (CNE), Colágeno - Quitosana (CQ), Colágeno - Quitosana - NAC - ϵ -PL (CQNE), Pré-Gel - NAC - ϵ -PL (PNE), Pré-Gel - Quitosana (PQ), Pré-Gel - Quitosana - NAC - ϵ -PL (PQNE), Quitosana - NAC - ϵ -PL (QNE). Como controles, foram utilizadas soluções de quitosana (Q), colágeno (C) e pré-gel (P).

Para preparar os *scaffolds* de CNE, PNE e QNE, 1 mg/mL de NAC e ϵ -PL foi adicionado às soluções de colágeno, pré-gel e quitosana previamente diluídas nas concentrações de 1 mg/mL, 1,5 mg/mL, 2 mg/mL e 3 mg/ml e homogeneizado em temperatura ambiente sob agitação (400rpm) por 20 minutos.

Para a preparação dos *scaffolds* de CQ e PQ, adicionou-se quitosana na proporção de 1:1 às soluções de colágeno e pré-gel previamente diluídas, conforme protocolo adaptado de Deng e colaboradores (2020), mantido sob agitação (400 rpm) à temperatura ambiente por 20-30 minutos. Posteriormente, 1mg/mL de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida - EDC (Sigma-Alcrich) e 1mg/mL de N-Hidroxisuccinimida - NHS (Sigma-Alcrich) foram adicionados para reticulação de quitosana com colágeno e pré-gel, adaptado de Cao e colaboradores (2020), e mantidos sob agitação (400 rpm), à temperatura ambiente, por 90 - 120 minutos.

Após a reticulação de colágeno-quitosana e pré-gel-quitosana, 1 mg/mL de NAC (Sigma-Aldrich) e ϵ -PL foi adicionado às soluções para preparar os *scaffolds* de CQNE e PQNE, conforme parâmetros previamente estabelecidos em estudos

anteriores com estes bioativos (não publicados). Para moldar os *scaffolds*, 200-300 µL de cada formulação e controles foram plaqueados por poço (placa de 96 poços) e congelados a -80° C por 1 hora. Em seguida, foram liofilizados *overnight*.

3.6. Ensaios de viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular, foi utilizada resazurina. Devido às características do *scaffold* que se dissolve quando colocado em meio de cultura, optou-se pelo método de contato indireto por extração de componentes. A linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCat) foi mantida em meio DMEM (Gibco, ThermoFisher), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e solução antibiótica-antimicótica (Gibco), sob condições padrão de cultura (37° C, 95% de ar umidificado e 5% de CO₂) até a confluência. Para este ensaio, as células (HaCat) foram plaqueadas em placa de 96 poços na quantidade de 1x10⁴ por poço e mantidas em estufa de CO₂ por 24 horas a 37° C.

Os *scaffolds* foram preparados em diferentes concentrações (1 mg/mL, 1,5 mg/mL, 2 mg/mL e 3 mg/mL) em triplicata, incubados em 200 µL de meio de cultura por *scaffold* e mantidos a 37° C por 24h. Após a incubação, 100 µL do meio contendo extrato do *scaffold* foram transferidos para uma placa de 96 poços contendo 1x10⁴ células por poço. Como controle positivo de citotoxicidade, foi adicionado Dimetilsulfóxido 5% - DMSO (Sigma-Aldrich). Após 72 horas, as células foram incubadas com 20 µL/poço de solução de Resazurina 3nM (Sigma-Aldrich) e mantidas por 3 horas, a 37° C. A viabilidade celular foi realizada com base na fluorescência média (FI):

$$Viabilidade (\%) = \frac{Fl (tratado) * 100}{Fl (controle)}$$

De acordo com os resultados desta triagem, a dose não-citotóxica para a célula foi escolhida para prosseguir com os demais ensaios.

3.7. Ensaios de *live/dead*

Os *scaffolds* foram preparados na concentração escolhida (1 mg/mL), incubados em 200 µL de meio de cultura por poço e mantidos em estufa a 37 °C, por

24h. Após a incubação, 100 µL de extrato de *scaffolds* foram pipetados e transferidos para uma placa de 96 poços contendo 1×10^4 células por poço. Como controle positivo de foi adicionado DMSO a 5%. Após 72 horas, o meio foi removido e foi adicionado 100 µL por poço de 3 µM de calceína AM (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific) e 2,5 µM de iodeto de propídeo - IP (Sigma-Aldrich). A placa foi mantida por 30 minutos a 37 °C. As imagens foram analisadas no Microscópio EVOS FL (Thermo Fisher Scientific).

3.8. Microscopia Eletronica de Varredura (MEV)

Para determinar as estruturas de poros dos *scaffolds* foi realizada a visualização dos materiais através de microscopia eletrônica de varredura - MEV (Zeiss EVO MA10). As amostras foram revestidas por pulverização catódica com uma camada de ouro (Au) para observação a 10 kV em vários níveis de ampliação (30x, 100x, 400x, 800x, 1600x). As superfícies do *scaffold* foram examinadas para verificar a média de tamanho dos poros utilizando o software ImageJ versão 1.4.

3.9. Análise FT-IR

A caracterização da bioconjugação do biomaterial de colágeno e quitosana foi analisada com base em espectros de infravermelho (IR) registrados à temperatura ambiente utilizando um espectrômetro *Fourier Transform Infrared* (FT-IR) (Agilent Cary 630) na faixa espectral de 500 a 4000 cm^{-1} , por meio de reflectância total atenuada (ATR). Os dados foram analisados usando o software Origin 2021.

3.10. Ensaios bacteriológicos

Para verificar o potencial antimicrobiano das diferentes formulações de *scaffolds* na concentração de 1 mg/mL, foi realizado um teste de sensibilidade para bactérias multirresistentes de relevância clínica como *Staphylococcus aureus* resistente à ampicilina (MRSA), *Acinetobacter baumani* e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (BAUER et al., 1996). Como controle positivo foram utilizados 10 µL de gentamicina (50mg/mL); e 10 µL de PBS 1x como controle negativo.

Primeiramente, as bactérias foram inoculadas em meio *Brain Heart Infusion* – BHI (Kasvi) e mantidas a 37° C, por 24 horas. Os inóculos foram transferidos para placas de *Tryptone Soy Agar* – TSA (Kasvi) e mantidos a 37 °C por 24 horas. As colônias foram incubadas em *Tryptic Soy Broth* – TSB (Kasvi) a 37 °C até atingirem turbidez de 0,5 na escala McFarland e a semeadura foi realizada na placa de petri. Em seguida, os *scaffolds* e controles foram colocados em secções e mantidos a 37°C por 24 horas e posteriormente as placas foram analisadas.

3.11. Testes *in vivo* em modelo experimental

Os testes *in vivo* foram realizados segundo Galiano *et al.* (2004), com modificações. Foram utilizados discos de polímero emborrachado e flexível (EVA) para sutura das bordas das feridas excisionais com o objetivo de evitar o fechamento das mesmas pelo processo de contração, responsável em grande parte pelo fechamento de feridas em roedores, simulando assim, a cicatrização de lesões por segunda intenção, em que a aproximação primária das bordas não é possível e a cicatrização ocorre por contração e epitelização.

Foram selecionadas 5 formulações de interesse para o tratamento das feridas: CQ, CQNE, PQ e PQNE e QNE, somente na concentração de 1 mg/mL.

Camundongos c57Bl/6 com idade entre 7 e 8 semanas foram agrupados da seguinte maneira:

- Grupo controle (feridas excisionais com o discos de silicone) – 16 animais
- Grupo tratado 1 (CQ) – 16 animais
- Grupo tratado 2 (CQNE) – 16 animais
- Grupo tratado 3 (PQ) – 16 animais
- Grupo tratado 4 (PQNE) – 16 animais
- Grupo tratado 5 (QNE) – 16 animais

Os animais foram previamente anestesiados intraperitonealmente, com xilazina/cetamina (10 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente), e submetidos à tricotomia e assepsia da região dorsal com álcool 70% v/v. Duas incisões equidistantes (feridas cutâneas excisionais) foram criadas através do pressionamento da pele da região dorsal dos animais com um *punch* de biópsia circular de 5 mm de diâmetro. Ao redor

das feridas recém-criadas foram fixados com cola rápida e suturados os discos de EVA com fio de sutura mononylon 3.0. Em seguida os *scaffolds* foram posicionados no centro da lesão (Figura 1).

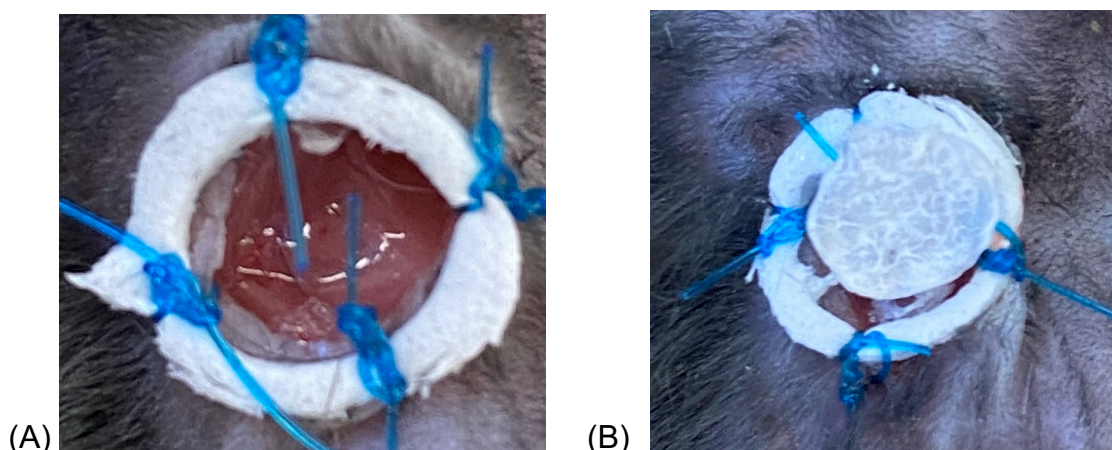


Figura 1. Modelo experimental de feridas exsisionais com uso do anel de EVA antes (A) e após (B) o tratamento com *scaffolds* de colágeno.

Foi feita a mensuração do diâmetro das feridas com o auxílio de paquímetro digital para acompanhamento da cinética de fechamento nos dias 0, 1, 3 e 7. O cálculo da área da ferida foi realizado multiplicando o maior eixo linear pelo menor eixo perpendicular.

A evolução do processo de cicatrização foi avaliada macroscopicamente por meio da mensuração da área das feridas, com o auxílio de um paquímetro digital, iniciando imediatamente após a indução das mesmas (dia 0, área inicial da ferida) e ocorrendo em intervalos pré-determinados (1, 3 e 7 dias) (CANESSO, *et al.*, 2014; MOREIRA *et al.*, 2015).

Para o cálculo da área da ferida foi utilizada a seguinte equação:

$$A = \left[\left(\frac{\text{diâmetro maior}}{2} \right) \times \left(\frac{\text{diâmetro menor}}{2} \right) \times \pi \right]$$

Onde: A = área mensurada

$\pi = 3,14$

Por sua vez, a porcentagem de fechamento da ferida relativo ao tamanho original da mesma foi calculada com base na seguinte equação:

$$\% \text{ de fechamento} = \left[1 - \left(\frac{A_f}{A_0} \right) \right] \times 100$$

Onde: A_f = Área da ferida mensurada em um intervalo de tempo.

A_0 = Área inicial da ferida, mensurada após a sua indução.

No 7º dia após a indução das feridas os animais foram eutanasiados. Para as análises histológicas e bioquímicas a região da ferida, junto da pele em seu entorno, foi coletada com o auxílio de um *punch* de biópsia circular de 8mm.

3.12. Análise histológica

Para as análises histológicas, as feridas e a pele do contorno de 8 animais de cada grupo (os demais foram armazenados para outras análises) foram coletadas com o auxílio de um *punch* de biópsia circular de 8 mm de diâmetro e os tecidos foram seccionados ao meio em dois fragmentos, permanecendo a cicatriz da ferida centralizada.

Os tecidos foram fragmentados e armazenados em formaldeído e processados conforme protocolo de técnicas histológicas de desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina (60 °C), cortados em micrótomo e preparadas lâminas para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram analisadas por microscopia óptica para observação do processo inflamatório e de re-epitelização da ferida, segundo a avaliação do tecido e aplicação de uma métrica de scores padronizados segundo Moura Estevão *et al.* (2019).

Brevemente, a análise morfológica do infiltrado inflamatório foi realizada a partir das secções histológicas de feridas obtidas no 7º dia após a lesão. Para análise histológica utilizou-se apenas lâminas com integridade tecidual que permite a avaliação completa da ferida (N=5 animais).

Foram atribuídas pontuações de 0-3, conforme os seguintes parâmetros: 0 - ausência de inflamação; 1 - inflamação discreta com presença de poucas células inflamatórias; 2 - inflamação moderada, com muitas células inflamatórias; 3 –

inflamação severa, com presença exagerada de células inflamatórias. Por sua vez, processo de reepitelização foi avaliado conforme os seguintes parâmetros: 0 – pele intacta; 1 – reepitelização discreta, epitelização parcial com menos de 1/3 da área de ferida coberta; 2 – reepitelização moderada, epitelização parcial com cobertura de mais de 1/3 da área da ferida; 3 – reepitelização completa.

3.13. Atividade de enzimas pró-inflamatórias (MPO e NAG)

Os demais fragmentos das feridas foram armazenados a -80°C e posteriormente foram pesados e processados para quantificação da atividade das enzimas N-acetil- β -glucosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO), para avaliação indireta do infiltrado de macrófagos e neutrófilos respectivamente.

Para a quantificação da atividade da NAG, as amostras foram homogeneizadas em 1 ml de solução NaCl 0,9% contendo 0,1% de Triton X-100 (Promega) e centrifugadas a $960 \times g$, por 10 minutos a 4°C . Posteriormente, 150 μL do sobrenadante de cada amostra foram adicionados a *ependorfs* previamente identificados, contendo 150 μL de tampão citrato/fosfato pH 4,5. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 μL das amostras em duplicata, nas quais foram adicionados 100 μL do substrato (p-nitrofenil-n-acetil- β -D-glicosaminida– Sigma), a 2,43 nM, também diluído em tampão citrato/fosfato pH 4,5. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C . Em seguida, ao término do período de incubação, foi acrescido 100 μL de tampão glicina 0,2 M pH 10,6. A leitura foi realizada na absorbância de 400 nm.

As amostras para quantificação da atividade de MPO foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato de sódio pH 5,4. O sobrenadante obtido (300 μL) foi retirado e acrescido de 600 μL de Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (HTAB, Sigma) 0,5% p/v diluído em tampão fosfato pH 5,4. Em seguida, as amostras foram sonicadas por 20 segundos e submetidas a 3 ciclos de congelamento rápido em nitrogênio líquido e aquecimento em banho-maria. Posteriormente, foram centrifugadas por 10 minutos a $10.000 \times g$. Para reação utilizou-se 200 μL de amostra e 100 μL de solução de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich, St. Louis) a 6,4mM dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), 100 μL de H_2O_2 a 2,4 mM e diluída em tampão fosfato.

A reação foi parada com a adição de 100 μL de ácido sulfúrico 4 M. A atividade da enzima MPO foi obtida pela leitura em espectrofotômetro na absorbância de 450nm.

3.14. Análise da vascularização

A contagem de vasos sanguíneos foi realizada em toda extensão da ferida, nas secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina, e quantificada pela medida da área em milímetros (número de vasos/ mm^2) utilizando o software ImageJ 1.4.

3.15. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa computacional com pacotes estatísticos *GraphPad Prism* versão 9.0 (GraphPad Software, Inc, EUA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis – viabilidade celular, fechamento da ferida, quantificação de enzimas MPO e NAG e a média de vasos/ mm^2 - foram analisadas usando o teste de comparação múltipla *One-way ANOVA*, seguido pelo pós-teste de Dunnet. Para a variável tamanho dos poros foi utilizado o pós teste de Kruskal Wallis. Os dados foram considerados significativos para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Desenvolvimento e caracterização dos *scaffolds*

A quantificação do colágeno pelo ensaio de hidroxiprolina de 250 mg de biomaterial solubilizado mostrou uma concentração média de 5,8 – 6,5 mg/mL de colágeno total. Este resultado foi considerado na diluição pré-gel para preparação de *scaffolds*.

Nesta pesquisa foram testadas dez formulações diferentes para comparação (C, CNE, CQ, CQNE, P, PNE, PQ, PQNE, Q, QNE). O processo detalhado do preparação de soluções, reticulação, moldagem e etapas de liofilização está ilustrado na Figura 2.

As formulações C, CNE, P, PNE, Q e QNE foram consideradas como controles para as formulações alvo da pesquisa, que são CQ, CQNE, PQ e PQNE. Essas formulações são representadas macroscopicamente na Figura 2.

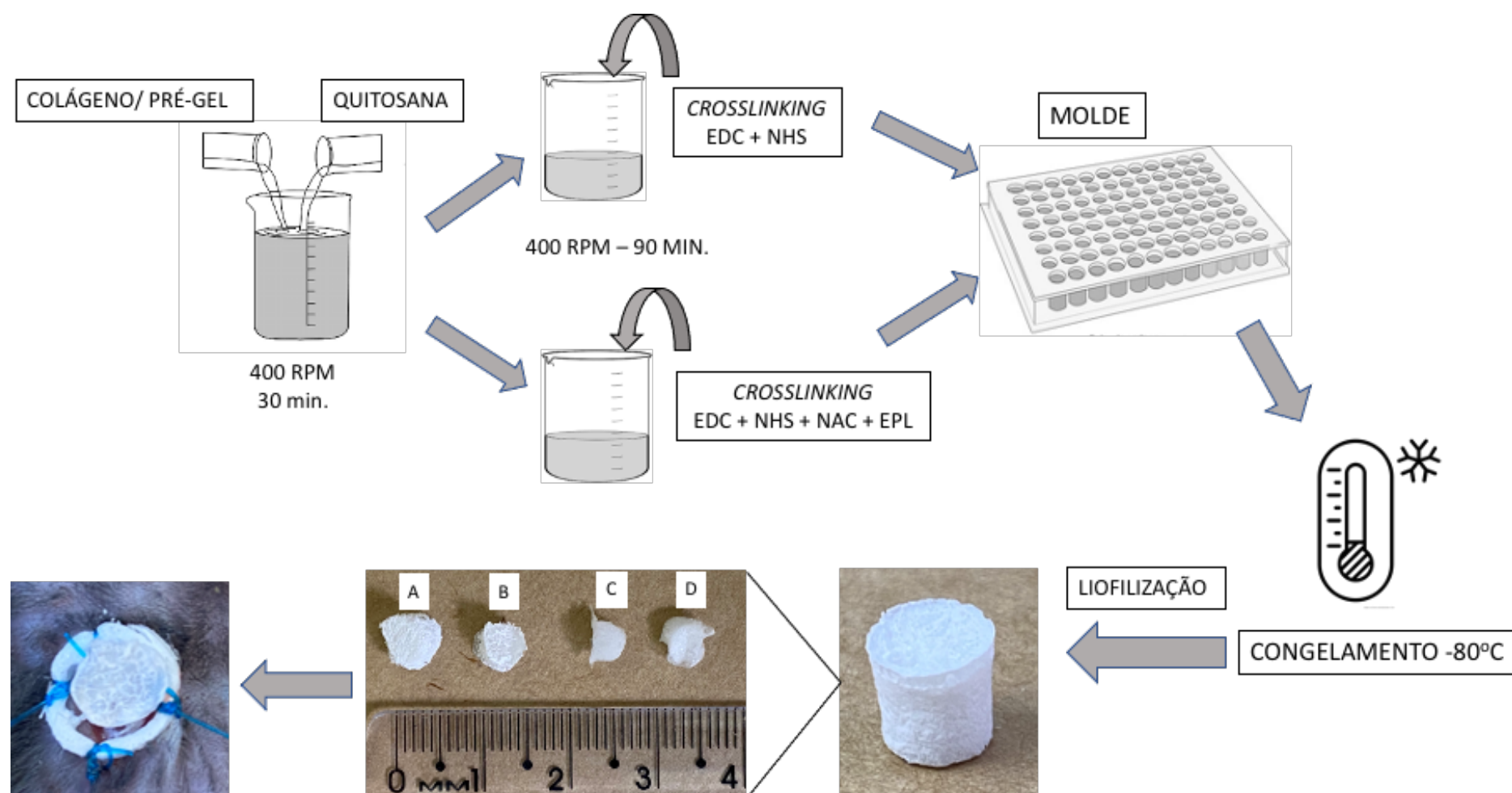


Figura 2. Esquema representativo da preparação de *scaffolds* formulados e amostra real de cada material testado (soluções de 1 mg/mL). (A) PQ (B) PQNE (C) CQ (D) CQNE.

4.2 Efeito do extrato de *scaffolds* na viabilidade da célula HaCaT

Primeiramente, foi realizado um ensaio de triagem empregando extratos das diferentes formulações do *scaffold* colagenoso nas concentrações de 1 mg/mL, 1,5 mg/mL, 2 mg/mL e 3 mg/mL em linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT), que resultou em alta viabilidade (acima de 80%) para todas as formulações contendo colágeno comercial e quitosana (Fig. 3), exceto para a formulação CQ 1,5 mg/mL (62%) (Fig. 3B). No entanto, apresentou baixa viabilidade (menos de 54%) para formulações de pré-gel, exceto no extrato de formulação PQ 1 mg/mL (75%) (Fig. 2A). Com base neste resultado de triagem, o *scaffold* de solução de 1 mg/mL foi escolhido para os outros ensaios.

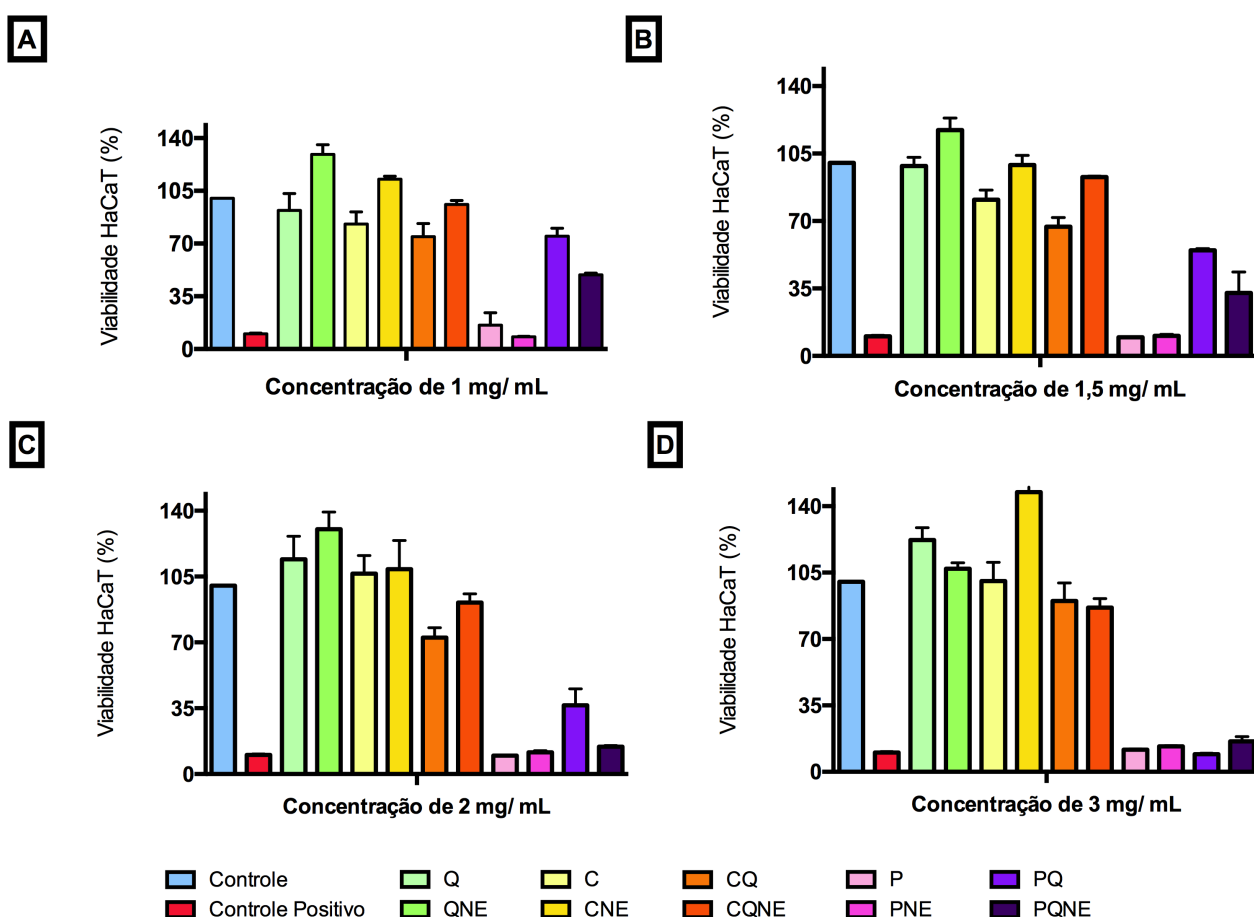


Figura 3. Viabilidade celular de extratos de *scaffolds*. (A) *scaffolds* de solução de 1 mg/mL (B) *scaffolds* de solução de 1,5 mg/mL (C) *scaffolds* de solução de 2 mg/mL (D) *scaffolds* de solução de 3 mg/mL. Controles: células não tratadas, tratadas com 5% de DMSO. C: Colágeno; CNE: Colágeno - NAC - ϵ -PL; CQ: Colágeno - Quitosana; CQNE: Colágeno - Quitosana - NAC - ϵ -PL; P: pré-gel; PNE: Pré-Gel - NAC - ϵ -PL; PQ: Pré-Gel - Quitosana; PQNE: Pré-Gel - Quitosana - NAC - ϵ -PL; Q: Quitosana; QNE

Quitosana - NAC - ε -PL. Os valores do eixo X representam concentrações em mg/mL. Teste *One-way ANOVA* com comparações múltiplas e pós-teste de *Dunnet* foram utilizados. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4.2. Avaliação da viabilidade celular por *live/dead*

Os resultados de viabilidade celular também foram avaliados por ensaio *live-dead* para confirmação morfológica dos resultados de citotoxicidade. Utilizou-se os marcadores fluorescentes calceína AM (marcador de células viáveis) e IP (marcador de morte celular que permeia em células com integridade da membrana celular prejudicada) em HaCaT tratado com extratos das formulações de 1 mg/mL. A coloração com calceína AM/IP mostrou que as células tratadas com C, CNE, CQ, CQNE, Q, QNE, e em menor quantidade PQ e PQNE, eram viáveis. As células tratadas com P e PNE estavam mortas e em menor quantidade de aderência por poço (Figura 4).

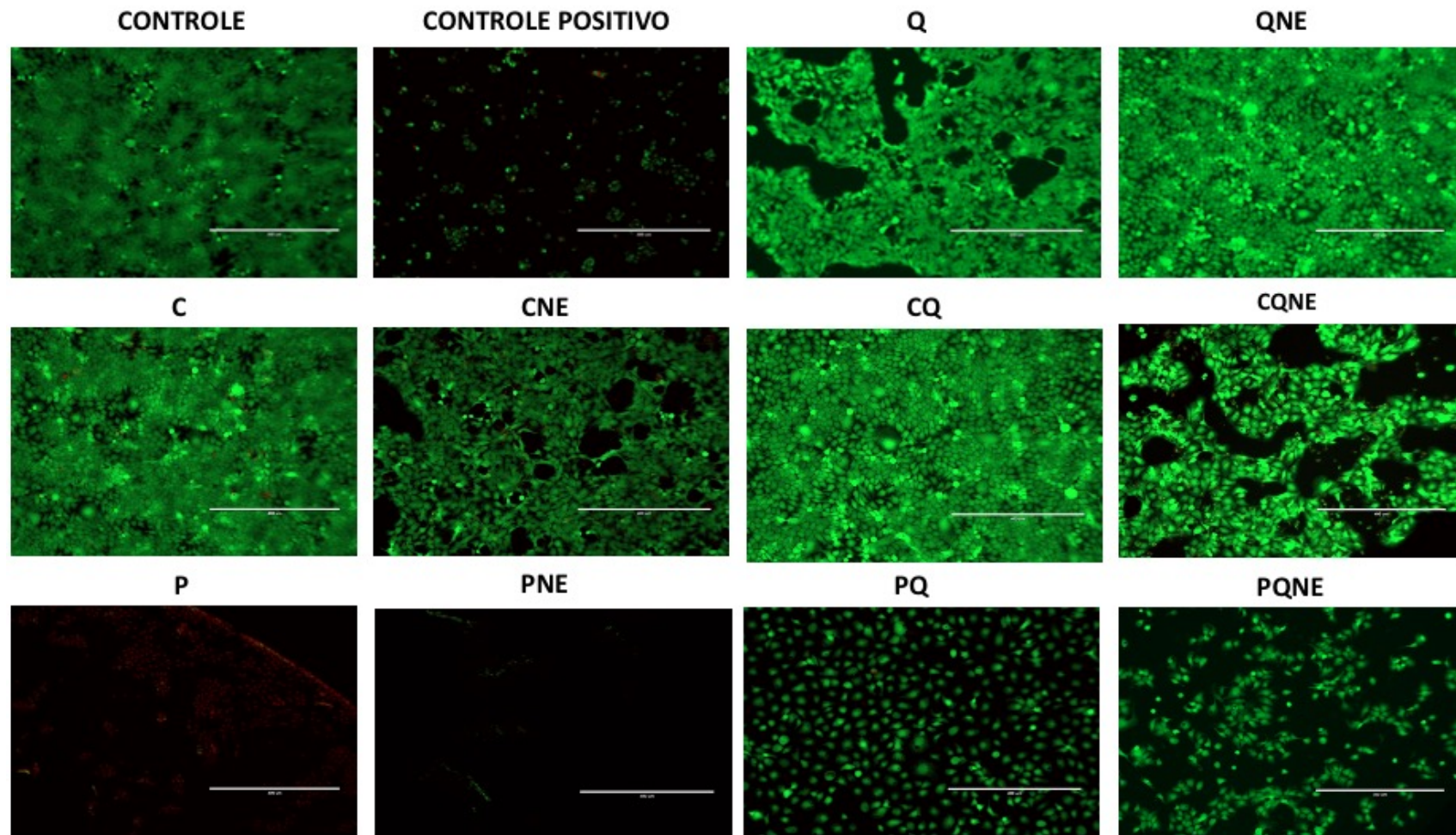


Figura 4. Ensaio de live/dead com extratos de *scaffolds* de solução de 1 mg/mL. As colorações com calceína AM e sobreposição de IP foi usada para todas as imagens. Controle: células não tratadas. Controle positivo: células tratadas com DMSO a 5%. C: Colágeno; CNE: Colágeno - NAC - ϵ -PL; CQ: Colágeno - Quitosana; CQNE: Colágeno - Quitosana - NAC - ϵ -PL; P: pré-gel; PNE: Pré-Gel - NAC - ϵ -PL; PQ: Pré-Gel - Quitosana; PQNE: Pré-Gel - Quitosana - NAC - ϵ -PL; Q: Quitosana; QNE Quitosana - NAC - ϵ -PL. Ampliação 100x. Barra de escala: 100 μ m.

4.3. Avaliação da bioconjugação de colágeno e quitosana

A reticulação com quitosana foi confirmada por análise FTIR (Fig. 5). Os picos em 1031 cm^{-1} e 1071 cm^{-1} correspondem ao alongamento C-O-C e outro pico em 2883 cm^{-1} corresponde ao alongamento C-H. São características do espectro de quitosana que foi observada para o complexo PQ, mas não apareceu nos espectros das amostras P ou PNE, sugerindo a ligação covalente de colágeno (proveniente do biomaterial) e quitosana.

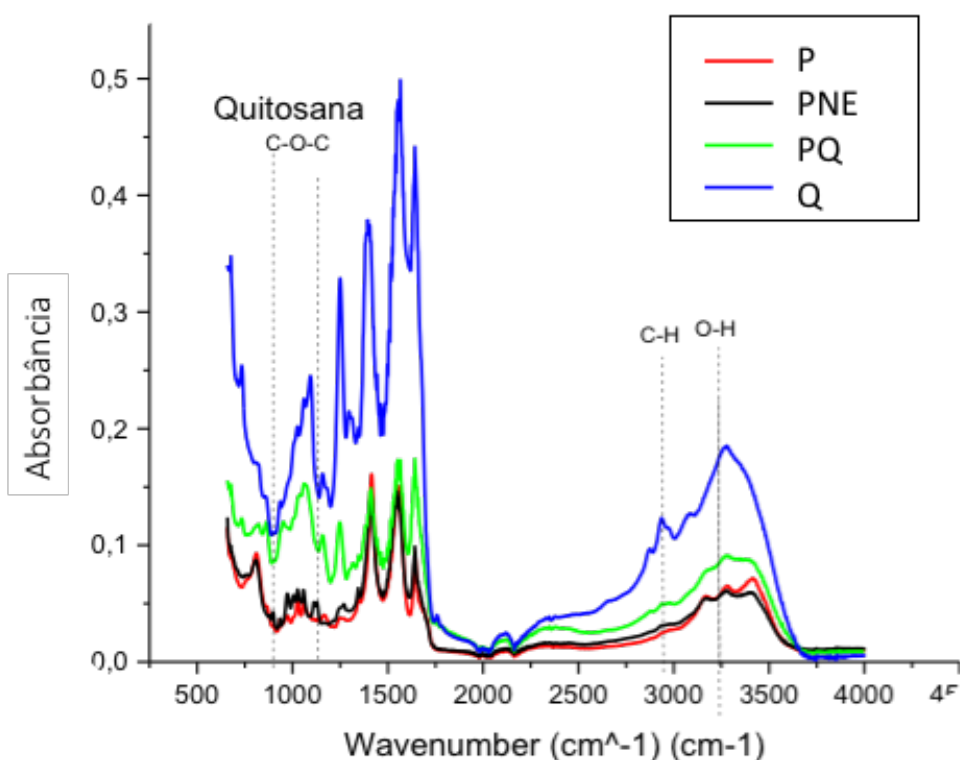


Figura 5. Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) de *scaffolds* derivados do biomaterial colagenoso bioconjugado com quitosana e bioativos NAC e ϵ -PL à temperatura ambiente. P: pré-gel; PNE: Pré-Gel - NAC - ϵ -PL; Q: Quitosana; PQ: Pré-Gel – Quitosana.

4.4. Avaliação da ultraestrutura e porosidade do *Scaffold*

A análise da ultraestrutura por MEV demonstrou que a reticulação de colágeno-quitosana e pré-gel-quitosana aumentou a porosidade do material nas amostras CQ, CQNE, PQ, PQNE (Figura 6). No entanto, a medida dos poros dos *scaffolds* não é homogênea e apresenta variações de tamanho.

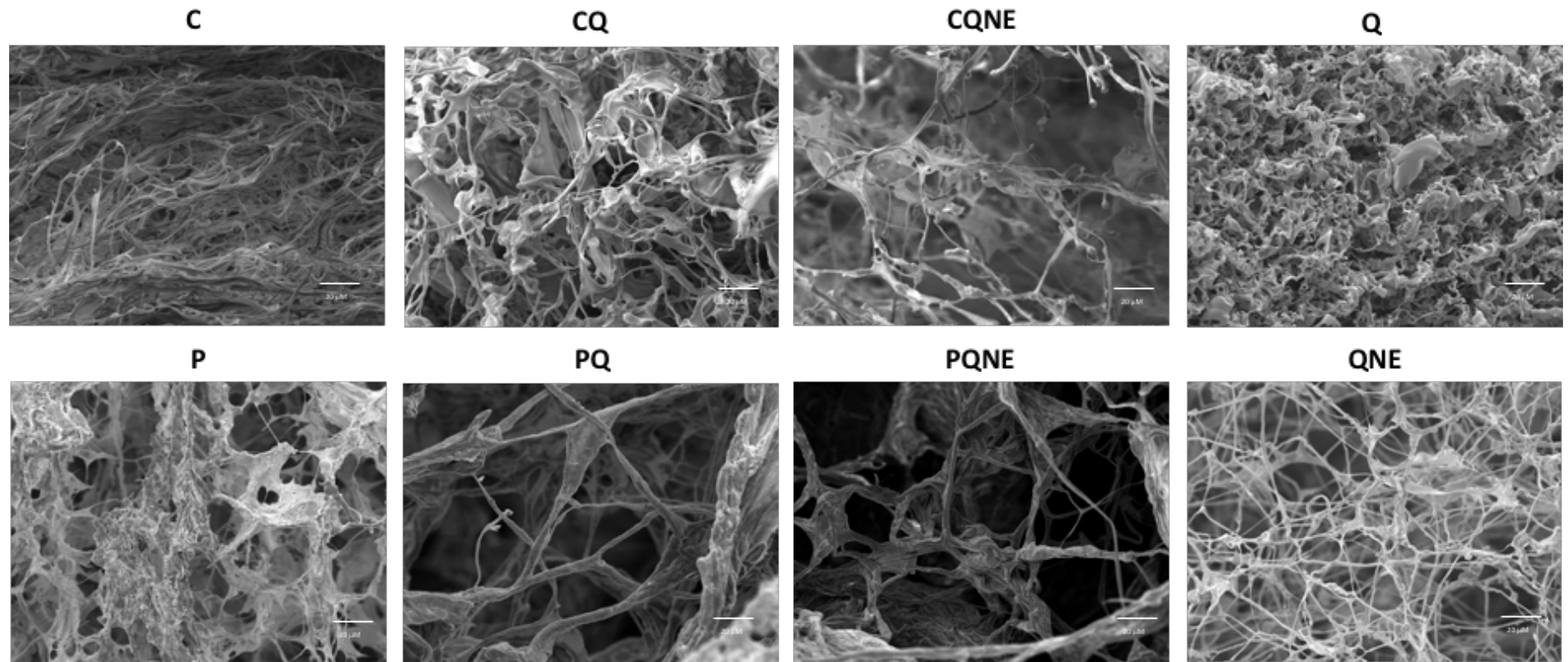


Figura 6. Morfologia e ultraestrutura de *scaffolds* porosos. C: Colágeno; CNE: Colágeno - NAC - ϵ -PL; CQ: Colágeno – Quitosana; CQNE: Colágeno - Quitosana - NAC - ϵ -PL; P: pré-gel; PNE: Pré-Gel - NAC - ϵ -PL; PQ: Pré-Gel – Quitosana; PQNE: Pré-Gel - Quitosana - NAC - ϵ -PL; Q: Quitosana; QNE Quitosana - NAC - ϵ -PL. Ampliação: 800x. Barra de escala: 20 μ m.

Os tamanhos médios dos poros foram C - 58,475 μm , CCh - 96,108 μm , CChNE - 104,854 μm , P - 53,996 μm , PCh - 136,6 μm , PChNE - 112,025 μm , Ch - 56,925 μm e ChNE - 66,9 μm (Figura 7).

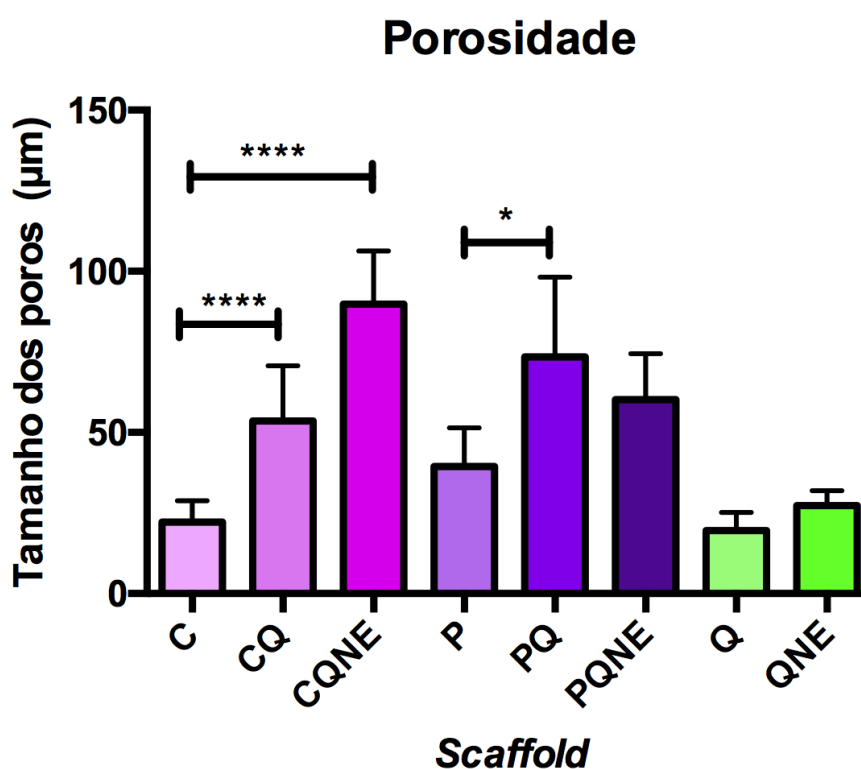


Figura 7. Avaliação do tamanho dos poros antes e após *crosslink* com quitosana. C: Colágeno; CNE: Colágeno - NAC - ϵ -PL; CQ: Colágeno – Quitosana; CQNE: Colágeno - Quitosana - NAC - ϵ -PL; P: pré-gel; PNE: Pré-Gel - NAC - ϵ -PL; PQ: Pré-Gel – Quitosana; PQNE: Pré-Gel - Quitosana - NAC - ϵ -PL; Q: Quitosana; QNE Quitosana - NAC - ϵ -PL.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao *scaffold* puro de cada material. Teste *One-way ANOVA* com comparações múltiplas e pós-teste de *Kruskal Wallis* foram utilizados. Diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

4.5. Ação antimicrobiana

Os *scaffolds* contendo NAC e ϵ -PL (CNE, CQNE, PNE, PQNE e QNE) demonstraram ação antibacteriana contra bactérias multirresistentes de relevância clínica como KPC, MRSA e *Acinetobacter baumani*. Este resultado pode ser observado na Figura 8 pela presença de um halo ao redor dos *scaffolds* com esta

propriedade, demonstrando proteção contra o crescimento de bactérias na região circunscrita a amostra, enquanto nas demais formulações (C, CQ P, PQ e Q) o efeito não foi observado.

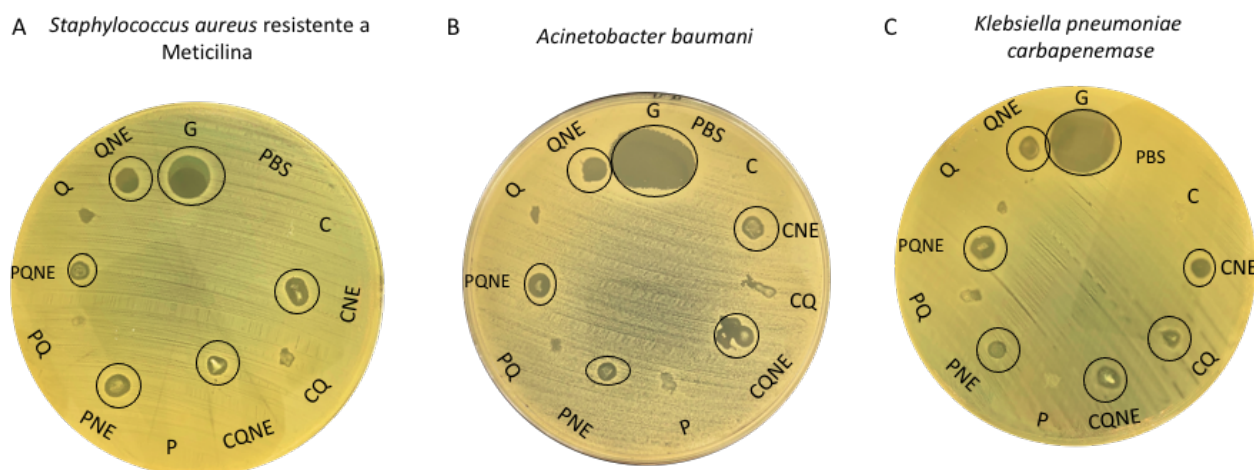


Figura 8. Efeito antibacteriano de *scaffolds* contendo NAC - ϵ -PL. (A) *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (B) *Acinetobacter baumani* (C) *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. Os círculos indicam a formação do halo. G: Gentamicina; PBS: Tampão Fosfato Salino; C: Colágeno; CNE: Colágeno - NAC - ϵ -PL; CQ: Colágeno - Quitosana; CQNE: Colágeno - Quitosana - NAC - ϵ -PL; P: pré-gel; PNE: Pré-Gel - NAC - ϵ -PL; PQ: Pré-Gel - Quitosana; PQNE: Pré-Gel - Quitosana - NAC - ϵ -PL; Q: Quitosana; QNE Quitosana - NAC - ϵ -PL.

4.6. Análise do fechamento da ferida

O modelo experimental de feridas excisionais com utilização do anel estabilizador para evitar a contração muscular característica dos camundongos. Os *scaffolds* para tratamento foram escolhidos após as análises *in vitro* conforme interesse para esta pesquisa, sendo estes CQ, CQNE, PQ, PQNE e QNE.

Na análise do fechamento das feridas, as formulações contendo Pré-gel (PNE e PQNE) e Quitosana (QNE) apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle nos dias 1, 3 e 7. Ao final do tratamento o grupo tratado com PNE apresentou 69,3% de fechamento da ferida, o grupo tratado com PQNE 71% e o grupo tratado com QNE 70%. Os demais grupos das formulações CQ, CQNE e PQ não apresentaram diferença significativa conforme Figura 9.

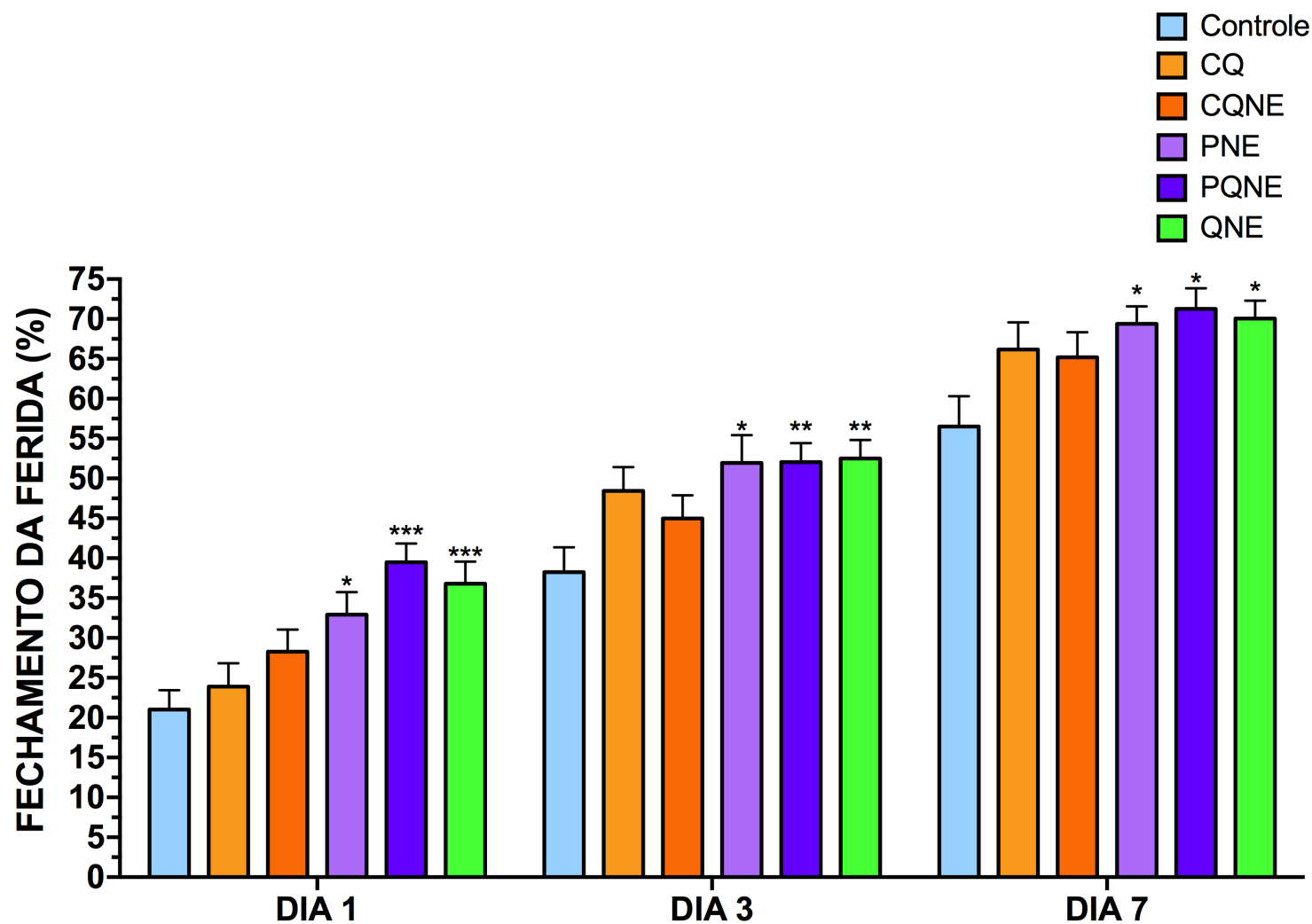


Figura 9. Fechamento da ferida nos dias 1, 3 e 7. CQ: Colágeno – Quitosana; CQNE: Colágeno - Quitosana - NAC - ϵ -PL; PQ: Pré-Gel – Quitosana; PQNE: Pré-Gel - Quitosana - NAC - ϵ -PL; Q: Quitosana; QNE Quitosana - NAC - ϵ -PL. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Teste *One-way ANOVA* com comparações múltiplas e pós-teste de *Dunnet* foram utilizados. Os dados foram considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$.

Os *scaffolds* foram progressivamente absorvidos sendo possível observar fragmentos no leito da ferida dentro de 24 horas e absorção completa em 72 horas. Observou-se presença de tecido de granulação pouco secretivo durante todo o tratamento. Não foram observados sinais macroscópicos de hemorragia, necrose tecidual ou infecção das feridas ao final do experimento (Figura 10). Os animais apresentaram padrões comportamentais compatíveis com bom estado geral de saúde.

No entanto, ao longo do experimento, alguns animais distribuídos aleatoriamente em todos os grupos, perderam o anel de EVA que rompeu-se com movimentos de fricção, invalidando a medida de fechamento que ocorreu por contração muscular, não permitindo a análise do tratamento. Portanto, foram analisadas somente feridas com presença do anel no dia da eutanásia.

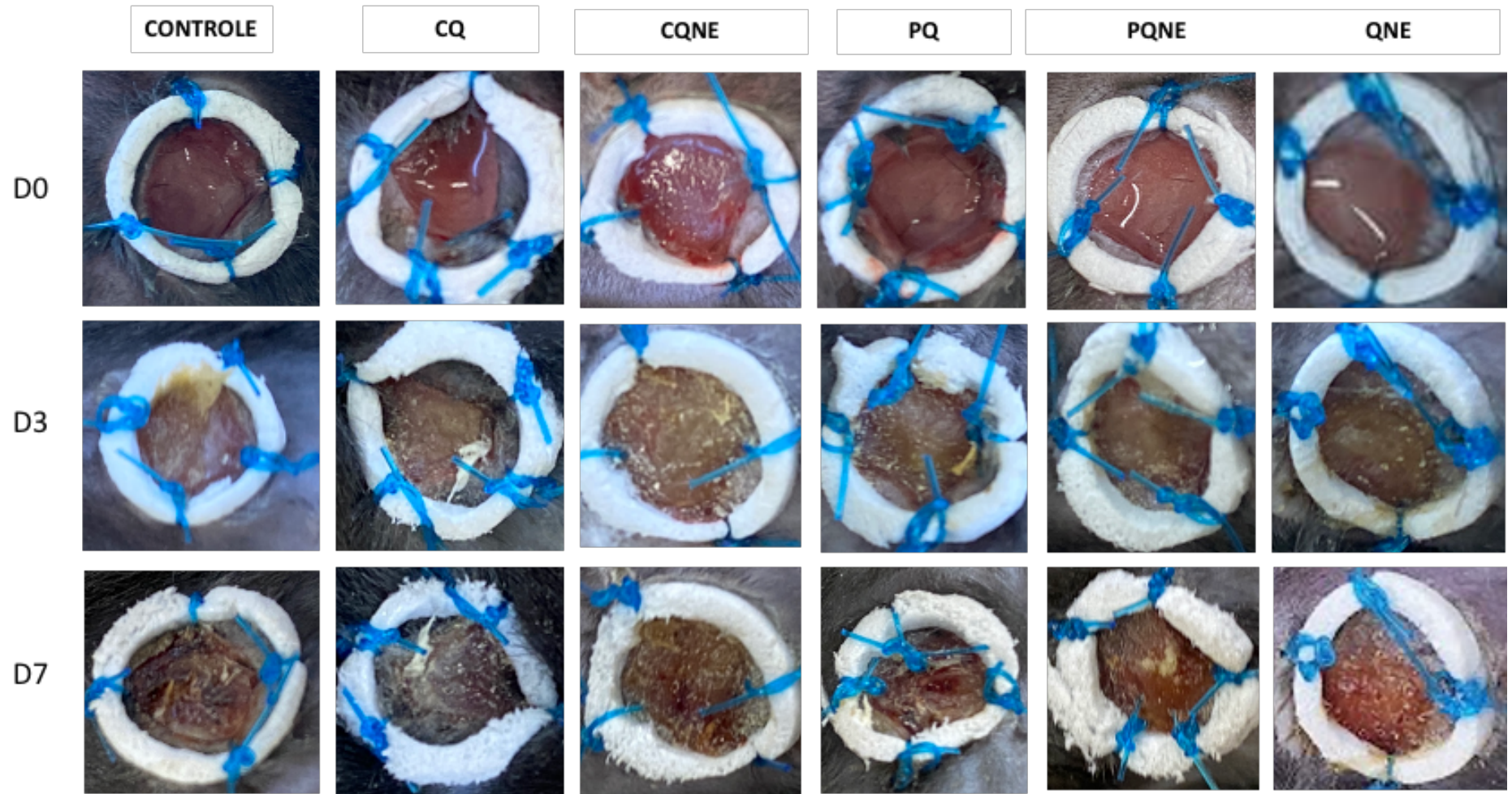


Figura 10. Imagens representativas do fechamento da ferida nos dias 0 (antes de colocar o *scaffold*), 3 e 7 dias. CQ: Colágeno – Quitosana; CQNE: Colágeno - Quitosana - NAC - ϵ -PL; PQ: Pré-Gel – Quitosana; PQNE: Pré-Gel - Quitosana - NAC - ϵ -PL; Q: Quitosana; QNE Quitosana - NAC - ϵ -PL.

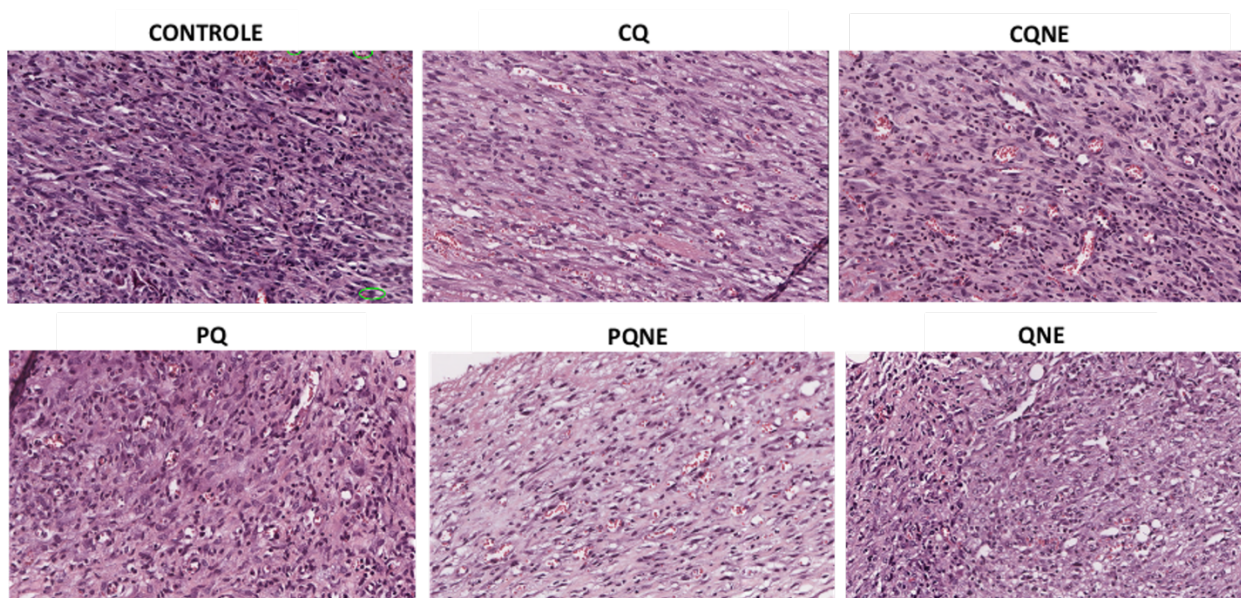
4.7. Avaliação do infiltrado inflamatório e epitelização

Para avaliar a formação do tecido de granulação e neovascularização foi realizada a análise histológica no 7º dia utilizando o SCORE de avaliação de inflamação e epitelização conforme pontuação de 0-3, sendo 0 ausência de inflamação/ pele intacta, 1 discreto com presença de poucas células inflamatórias/ 1/3 do epitélio presente, 2 moderado com muitas células inflamatórias/ mais de 1/3 do epitélio formado e 3 severo com presença exagerada de células inflamatórias/ epitélio completo (Quadro 1).

Observou-se infiltrado inflamatório moderado nos tratamentos com as formulações CQ, PQNE e QNE (score 2) com presença discreta de células inflamatórias nas extremidades da ferida, e moderada na região central, indicando o processo de cicatrização das bordas para o centro evidenciado por uma discreta organização da MEC. Os grupos controle e demais tratamentos apresentaram inflamação severa evidenciada pela presença exacerbada de células inflamatórias na maior parte da extensão da ferida (Figura 11). A epitelização foi completa (3) para C, CQ, PQNE e QNE; parcial > 1/3 para o grupo PQ (2) e parcial < 1/3 para CQNE (1).

Não foi observada a presença do *scaffold* a nível histológico, indicando completa absorção após 7 dias de tratamento. Para análise histológica utilizou-se apenas lâminas com integridade tecidual que permite a avaliação completa da ferida (N=5 animais).

(A)



(B)

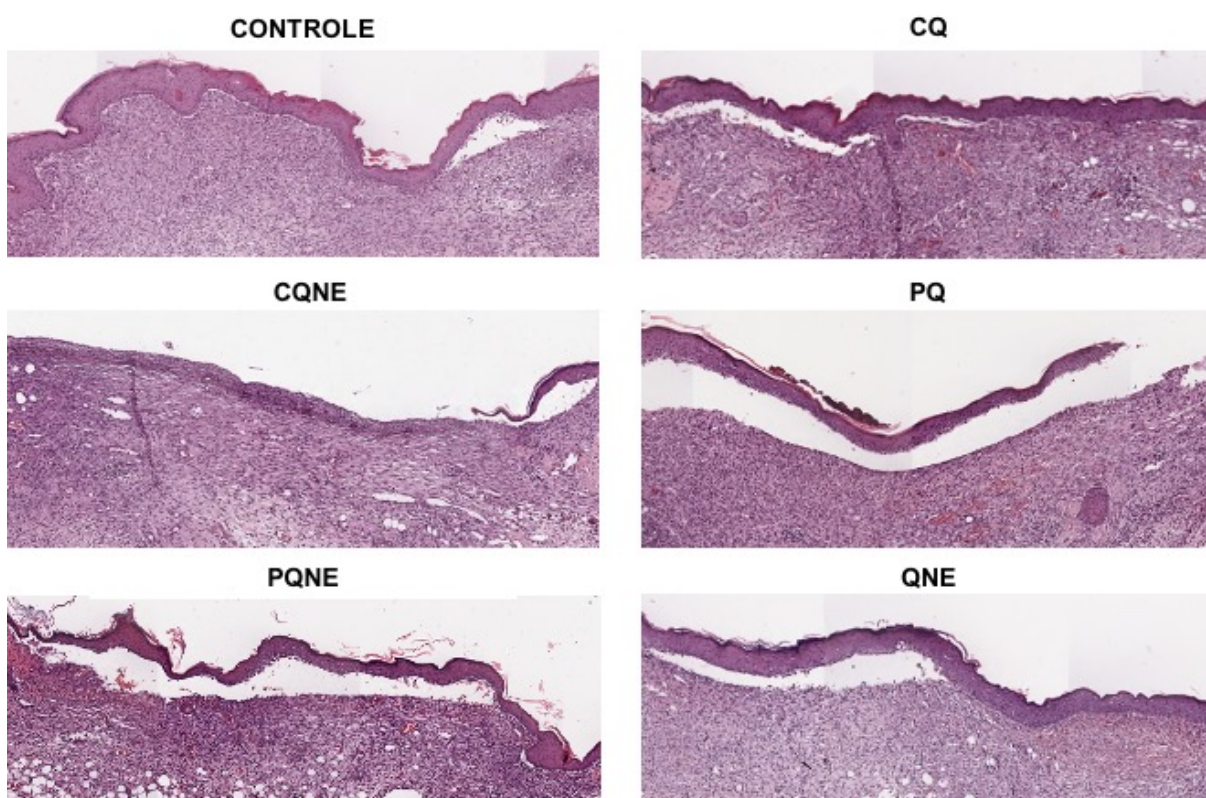


Figura 11. Imagens representativas do infiltrado inflamatório das feridas (A) e epiteliação (B). CQ: Colágeno – Quitosana; CQNE: Colágeno - Quitosana - NAC - ϵ -PL; PQ: Pré-Gel – Quitosana; PQNE: Pré-Gel - Quitosana - NAC - ϵ -PL; Q: Quitosana; QNE Quitosana - NAC - ϵ -PL. Aumento de 20x utilizando o software ImageScope.

Quadro 1. Score de inflamação e epitelização.

SCORE	CONTROLE	CQ	CQNE	PQ	PQNE	QNE
INFLAMAÇÃO	3	2	3	3	2	2
EPITELIZAÇÃO	3	3	1	2	3	3

CQ: Colágeno – Quitosana; CQNE: Colágeno - Quitosana - NAC - ϵ -PL; PQ: Pré-Gel – Quitosana; PQNE: Pré-Gel - Quitosana - NAC - ϵ -PL; Q: Quitosana; QNE Quitosana - NAC - ϵ -PL.

4.8. Avaliação da atividade das enzimas pró-inflamatórias (MPO e NAG)

As atividades das enzimas NAG e MPO foram avaliadas após eutanásia dos animais para determinar a atividade de macrófagos e neutrófilos nas feridas, respectivamente. Observou-se redução significativa de NAG e MPO nas lesões tratadas com as formulações PQNE (26,8 NAG nmol/mg; 1,5 MPO OD/g) e QNE (24,6 NAG nmol/mg; 1,3 MPO OD/g) quando comparadas ao grupo controle (36,5 NAG nmol/mg; 3,7 MPO OD/g), os demais tratamentos não apresentaram resultados estatisticamente significativos (Figuras 12 e 13).

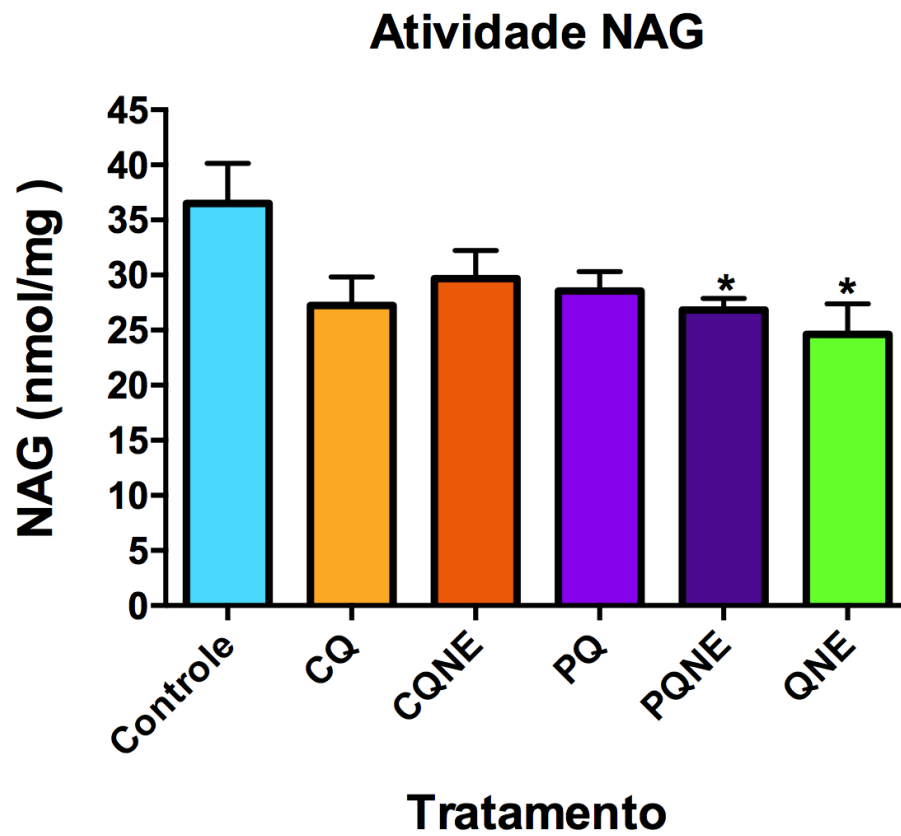


Figura 12. Quantificação da atividade de NAG. CQ: Colágeno – Quitosana; CQNE: Colágeno - Quitosana - NAC - ϵ -PL; PQ: Pré-Gel – Quitosana; PQNE: Pré-Gel - Quitosana - NAC - ϵ -PL; Q: Quitosana; QNE Quitosana - NAC - ϵ -PL.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Teste One-way ANOVA com comparações múltiplas e pós-teste de Dunnet foram utilizados. Os dados foram considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$.

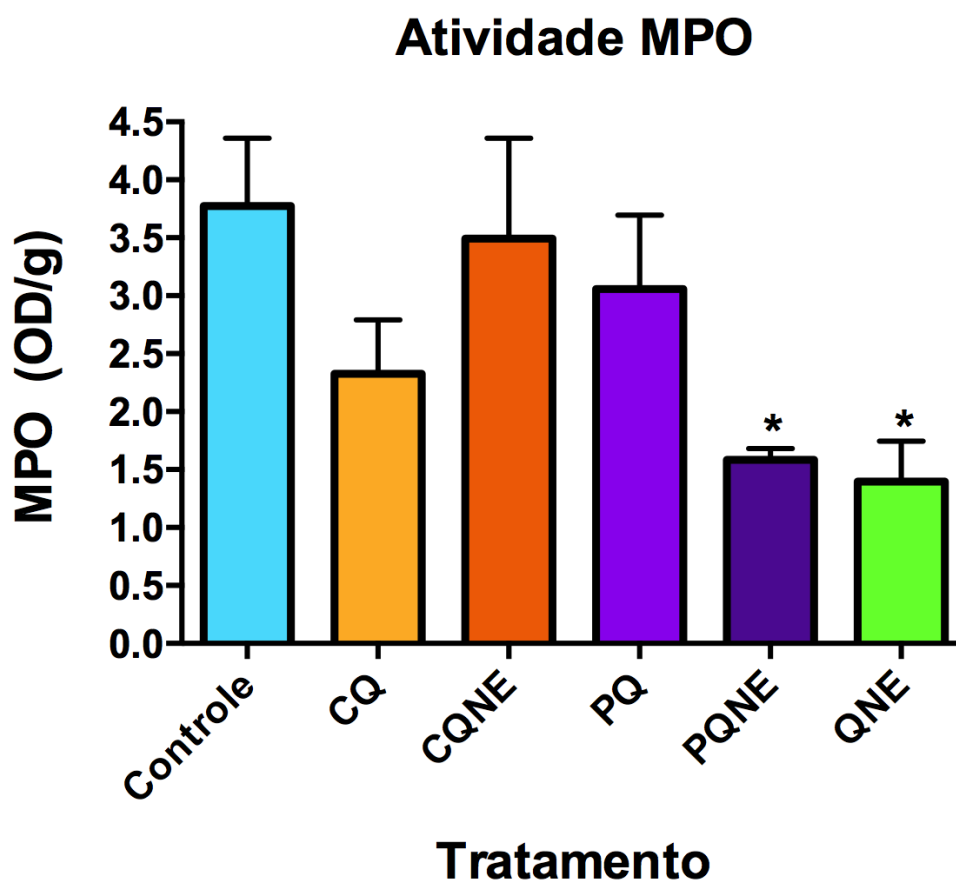


Figura 13. Quantificação da enzima mieloperoxidase. CQ: Colágeno – Quitosana; CQNE: Colágeno - Quitosana - NAC - ϵ -PL; PQ: Pré-Gel – Quitosana; PQNE: Pré-Gel - Quitosana - NAC - ϵ -PL; Q: Quitosana; QNE Quitosana - NAC - ϵ -PL.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Teste One-way ANOVA com comparações múltiplas e pós-teste de Dunnet foram utilizados. Os dados foram considerados significativos quando o valor de p foi menor que 0,05.

4.9. Vascularização

As formulações de *scaffolds* PQNE (91 vasos/mm²) e QNE (80 vasos/mm²) apresentaram aumento significativo na quantidade de vasos por área da ferida em comparação ao controle (63 vasos/mm²). Os demais grupos não tiveram resultados estatisticamente significativos (Figura 14).

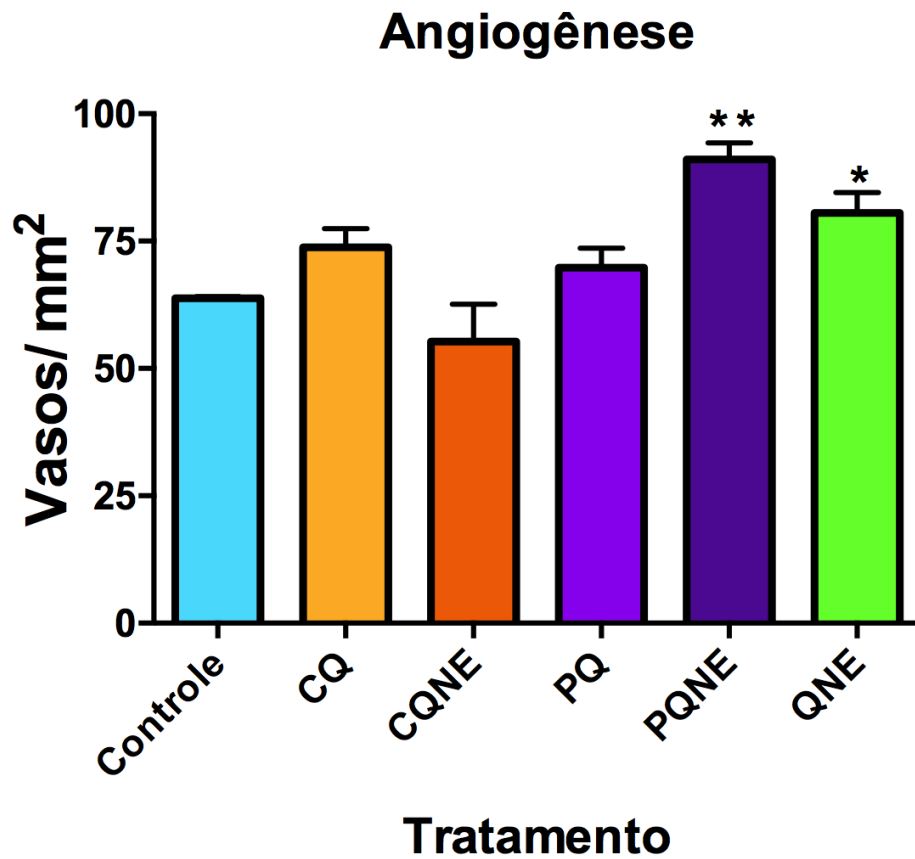


Figura 14. Efeito dos *scaffolds* na angiogênese no processo de cicatrização. CQ: Colágeno – Quitosana; CQNE: Colágeno - Quitosana - NAC - ϵ -PL; PQ: Pré-Gel – Quitosana; PQNE: Pré-Gel - Quitosana - NAC - ϵ -PL; Q: Quitosana; QNE Quitosana - NAC - ϵ -PL.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Teste One-way ANOVA com comparações múltiplas e pós-teste de Dunnet foram utilizados. Os dados foram considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Feridas crônicas, como úlceras de pressão, úlceras de pé diabético e úlceras venosas de perna, estão associadas a altos custos, maior tempo de internação, baixa qualidade de vida e morbidade e mortalidade significativas (OLSSON et al., 2019). Uma ferida crônica se desenvolve quando a progressão através das fases normais da cicatrização da ferida é interrompida devido traumas, infecções e outros processos patológicos, criando um ambiente hostil com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, aumento das metaloproteinases da matriz (MMPs), destruição dos componentes da matriz extracelular (MEC) e diminuição da atividade de fatores de crescimento e outros mediadores solúveis (IZADI & GANCHI, 2005). O advento de terapias avançadas de tratamento de feridas permite uma abordagem direcionada para o tratamento de feridas que não cicatrizam (BALSA & CULP, 2015; BOATENG & CATANZANO, 2015).

Nesse contexto, o desenvolvimento de coberturas para feridas que proporcionem as condições adequadas para acelerar o processo de cicatrização ou prevenir a cronicidade tem sido alvo de pesquisas (BOATENG & CATANZANO, 2015). As coberturas tradicionais com gaze seca podem retardar o processo ou traumatizar a área quando removidos. Biopolímeros são alvos de pesquisas para medicina regenerativa que auxiliam no desenvolvimento de *scaffolds* contendo substâncias bioativas, nutrientes ou fatores de crescimento, criando a substituição de estruturas da matriz extracelular para restaurar a lesão (GOODARZI, 2018; SAHANA, 2018).

No presente estudo, um biomaterial rico em colágeno, de baixo custo e de fácil obtenção foi utilizado para a fabricação de *scaffolds* com diferentes bioativos como quitosana, NAC e ε -PL. O mesmo procedimento foi realizado utilizando o colágeno comercial tipo I para comparação de eficácia.

Na análise de viabilidade celular foi observada toxicidade quando as células de queratinócitos humanos HaCaT foram tratadas com P e PNE. No entanto, ao adicionar quitosana ao composto contendo o biomaterial - PQ, PQNE - houve aumento da viabilidade celular (maior que 70%) em soluções de *scaffolds* de 1 mg/mL. A viabilidade celular foi confirmada para demais tratamentos utilizando o colágeno comercial (C, CQ, CNE, CQNE) e quitosana (Q, QNE), com morfologia celular preservada. Este ensaio foi realizado como teste de triagem para escolha da

concentração ideal, e verificação de biocompatibilidade para prosseguimento dos testes *in vivo*.

Esses resultados demonstram maior biocompatibilidade do colágeno comercial em comparação aos *scaffolds* de pré-gel derivados do biomaterial. A quitosana também apresentou alta biocompatibilidade e, quando foi bioconjugada com o pré-gel, reduziu sua citotoxicidade. O re-processamento do pré-gel ou a purificação do biomaterial pode ser favorável para aumento da biocompatibilidade *in vitro*. Por outro lado, os resultados encontrados em um ensaio *in vitro* não excluem a biocompatibilidade *in vivo* (ISO, 2002).

O colágeno tipo I é o componente mais importante no reparo tecidual. O equilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno é um fator chave na cicatrização de feridas. No entanto, em feridas crônicas, a taxa de degradação do colágeno supera a taxa de síntese, em decorrência da inflamação cronicada. Para compensar a perda de colágeno, a suplementação de colágeno exógeno no local da ferida pode ser escolhida (SAHANA, 2018; MOHD, 2015). Portanto, biomateriais de colágeno de origem animal, e *scaffolds* feitos desses materiais, foram adaptados para o tratamento de feridas crônicas, a fim de criar um ambiente que mimetize a matriz extracelular para facilitar a adesão celular e prevenir a ação de radicais livres e proteases, que possam deteriorar o tecido se sua atividade torna-se descontrolada (HAN, 2017; CULLEN, 2002).

Corroborando os resultados, um estudo com formulações de colágeno conjugado com hidrogel e quitosana mostrou que a viabilidade das células L929 e das células-tronco mesenquimais humanas foi maior do que os grupos controle. Além disso, a proporção de células mortas no total era extremamente baixa e as células tinham morfologia celular normal (CAO, 2020). Outra pesquisa usando criogéis de colágeno-quitosana marinho também mostrou comportamento não citotóxico (80%) para células L929, confirmado por ensaio *live/dead*, mostrando células predominantemente vivas (CARVALHO, 2019).

O colágeno tipo I é o componente mais importante no reparo tecidual. O equilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno é um fator chave na cicatrização de feridas. No entanto, em feridas crônicas, a taxa de degradação do colágeno supera a taxa de síntese, em decorrência da inflamação cronicada. Para compensar a perda de colágeno, a suplementação de colágeno exógeno no local da ferida pode ser

escolhida (SAHANA, 2018; MOHD, 2015). Portanto, biomateriais de colágeno de origem animal, e *scaffolds* feitos desses materiais, foram adaptados para o tratamento de feridas crônicas, a fim de criar um ambiente que mimetize a matriz extracelular para facilitar a adesão celular e prevenir a ação de radicais livres e proteases, que possam deteriorar o tecido se sua atividade torna-se descontrolada (HAN, 2017; CULLEN, 2002).

O advento de terapias avançadas permite uma abordagem direcionada para o tratamento de feridas que não cicatrizam, abordando defeitos moleculares específicos na cicatrização (DAS & BAKER, 2016). As metaloproteinases de matriz (MMPs) são endopeptidases que participam de processos fisiológicos do desenvolvimento e reparo tecidual (RICARD-BLUM, 2011). No entanto, em níveis mais elevados, as MPs degradam o colágeno não viável e também o colágeno viável necessário para a cicatrização, levando a cronificação da ferida ao impedir que a MEC seja formada e consequentemente o tecido de granulação. Os produtos à base de colágeno atuam como substrato de sacrifício para degradação e regulação dos níveis de MPs, evitando maiores danos à MEC e a estrutura colagenosa originária do tecido lesionado (BRETT, 2008; KALLIS & FRIEDMAN, 2018).

De acordo com Su e colaboradores (2021), o colágeno natural é facilmente biodegradado e possui fracas propriedades mecânicas, sendo deteriorado em ambiente úmido ou devido a erosão bacteriana. Os autores referem que devido à tais propriedades, diversos métodos de reticulação estão sendo investigados para melhorar os efeitos de hidrogéis de colágeno bioconjugados com biopolímeros em regeneração tecidual.

Shivakumar e colaboradores (2021), relatam que a utilização de coberturas de colágeno nanocompostas com quitosana não apenas inibem infecções microbianas, mas também inibem a atividade das metaloproteinases da matriz da ferida por células inflamatórias que estão presentes em quantidades excessivas nas feridas crônicas. Além disso, os autores revelaram que o substrato dérmico proposto de colágeno-quitosana auxilia tanto a vascularização quanto a proliferação celular do tecido.

Para avaliar a bioconjugação da quitosana com o biomaterial colagenoso proposto neste estudo, foi realizada espectroscopia no infravermelho das amostras. A reticulação de colágeno e quitosana bioconjugados por EDC/NHS foi confirmada por um aumento de intensidade nos espectros distintos de quitosana nas amostras

bioconjugadas com pré-gel. Conforme encontrado por Rafat et al. (2008), em um estudo de avaliação de crosslinking quitosana-colágeno, essas bandas correspondem a ligações covalentes amida e amina entre colágeno e quitosana.

Sorushanova e colaboradores (2018), demonstraram que a reticulação utilizando EDC/NHS em produtos de colágeno envolve a ativação de grupos carboxilas que se ligam a grupos amina de lisina e resíduos de hidroxilisina no colágeno. Este processamento resulta em materiais à base de colágeno com maior biocompatibilidade, porém com resistência mecânica reduzida. Os *scaffolds* com poros entre 20-120 μm de diâmetro são adequados para a regeneração do tecido cutâneo, melhorando a fixação e proliferação celular, além da angiogênese (MOHD, 2015). Como esperado, os resultados encontrados no MEV demonstram a ultraestrutura das diferentes formulações, com amostras de materiais puros de pré-gel, colágeno e quitosana (P, C, Q) com estratificação mais densa e estruturas de poros menores entre 53 - 66 μm . Os *scaffolds* contendo colágeno-quitosana (CQ, CQNE) ou pré-gel-quitosana (PQ, PQNE) apresentaram poros maiores variando de 96 a 136 μm . Outras pesquisas (CAO, 2020; CARVALHO, 2020) encontraram o mesmo resultado, em que estruturas contendo reticulação colágeno-quitosana apresentam poros maiores do que materiais puros.

Corroborando esses resultados, Kafi e colaboradores (2019), demonstraram que os *scaffolds* de colágeno e quitosana apresentaram uma estrutura mais porosa e homogênea quando comparados aos controles. Os autores relatam que *scaffolds* mais porosos proporcionam maior proliferação celular, demonstrando que a bioconjugação de matrizes possui propriedades físicas superiores ao colágeno puro, como estimular a angiogênese e o recrutamento de células endoteliais. O mecanismo de variação da porosidade nas formulações de quitosana e colágeno ocorre durante o congelamento e formação de cristais de gelo que servem como núcleo para as biomoléculas compactadas (SORUSHANOVA et al., 2018; KAFI, 2019).

Em outro estudo, Azad e colaboradores (2004) empregaram membranas de quitosana como coberturas para feridas. Verificou-se que as membranas reticuladas de quitosana promovem cicatrização rápida devido à sua porosidade em comparação a quitosana não processada. Portanto, conclui-se que a reticulação dos materiais com quitosana tornam esse material mais adequado para alguns tipos de regeneração

tecidual que necessitam que o biomaterial seja adentrado mais rapidamente por células do tecido adjacente

A infecção bacteriana de origem hospitalar é uma complicação grave no tratamento de feridas crônicas, que podem formar biofilmes resistentes a antibióticos. Para prevenir tal complicação, coberturas com substâncias antibacterianas são uma opção desejável (EVELHOCH, 2020). A presença do patógeno MRSA é cada vez mais comum em feridas de tecidos moles, o que aumenta o risco de bacteremia e infecção de outros órgãos pelo microorganismo (BESSA et al., 2015). Entre bactérias Gram-negativas, a *P. aeruginosa* multiresistentes são de grande preocupação clínica e tem sido frequentemente isolada em feridas crônicas (BESSA et al., 2015; EVELHOCH, 2020).

A quitosana tem sido utilizada como agente cicatrizante de feridas e tem ação hemostática em contato com feridas traumáticas, através da adesão plaquetária, promove aglutinação eritrocitária e induz a ativação de macrófagos (ORYAN, 2017; KIM, 2018). Assim, hidrogéis de quitosana bioconjugados com colágeno vêm sendo estudados para aplicação na regeneração tecidual, devido à biocompatibilidade e porosidade que promovem a proliferação celular (CARVALHO, 2020; KAFI, 2019).

Diversos estudos demonstram a importância deste biopolímero como alternativa econômica para o tratamento de feridas. Zhang et al., (2021) demonstrou a ação antimicrobiana de *scaffolds* bioconjugados de quitosana com colágeno contra bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

Os resultados apresentaram biocompatibilidade do tratamento em modelos *in vivo* e melhor cicatrização quando comparado ao controle e tratamento com colágeno puro. Em outro estudo conduzido por Yang e colaboradores (2020), hidrogéis com estrutura porosa a base de quitosana bioconjugada com polyvinylalcohol e ϵ -PL, apresentaram excelentes resultados na cicatrização e re-epitelização de feridas e modelo experimental utilizando camundongos. Além disso apresentou alta biocompatibilidade e ação antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*.

A ação antibacteriana dos aditivos NAC e ϵ -PL nos *scaffolds* deste estudo foi confirmada pelo ensaio bacteriológico. Em um estudo realizado por Mayandi e colaboradores (2020), o ϵ -PL foi utilizado como bioativo em coberturas e demonstrou eficácia na redução da carga bacteriana e promoveu a cicatrização tecidual com melhores resultados que as coberturas convencionais. Na fase inflamatória da

cicatrização, os neutrófilos atuam descontaminando a lesão. No entanto, em feridas crônicas podem causar danos ao produzir radicais livres e espécies reativas de oxigênio, o que resulta em um aumento do estresse oxidativo, com consequente retardo do processo de cicatrização (LANDEN, 2016). Chen e colaboradores (2021), relata que ϵ -PL apresenta biocompatibilidade e baixa toxicidade tecidual, também demonstra melhor desempenho antibacteriano quando combinado com oligômeros de quitosana. Meng *et al.* (2021), demonstrou que em uma formulação de hidrogel conjugada com ácido tânico a ϵ -PL interage com a membrana celular do microrganismo alterando a parede celular sendo adsorvida na superfície e ocasionando a morte celular (MENG *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a N-acetilcisteína atua como um importante bioativo na redução da formação de biofilmes como demonstrado por Guerini e colaboradores (2021). A ação antioxidante de NAC somada a ação de antibióticos combate o estresse oxidativo em infecções causadas por *P. aeruginosa*, bem como a atividade antibiofilme de micropartículas carregadas com NAC. Costa e colaboradores (2017), apontam que NAC bioconjugado com quitosana atua impedindo a adesão de *S. aureus* resistente a meticilina prejudicando a formação de biofilme, sem induzir efeitos citotóxicos. O efeito antiadesivo observado na formulação deve-se a redução dos grupos amina livres disponíveis na quitosana, o aumento da hidrofilicidade que reduz a adesão bacteriana por redução da adsorção proteica. Li e colaboradores (2020) realizaram um estudo em feridas crônicas infectadas em camundongos, utilizando o NAC como agente antibiótico contra *P. aeruginosa*. Os resultados apontaram ação antibiofilme *in vitro* contra o exsudato das feridas avaliadas. Os autores mostram que NAC causa a morte bacteriana e destruição do biofilme por penetração na membrana celular, interrompendo a síntese de proteínas, promovendo o desbridamento da ferida.

Observou-se neste estudo ação antimicrobiana dos *scaffolds* quando conjugados com NAC/ ϵ -PL em comparação com demais formulações contra bactérias multirresistentes de relevância clínica no tratamento de feridas crônicas como *A. baumani*, KPC e MRSA. A combinação de colágeno e quitosana pode ser encontrada amplamente na literatura, bem como a conjugação de quitosana com NAC ou ϵ -PL conforme já citado. Portanto, a bioconjugação desses quatro compostos, colágeno, quitosana, NAC e ϵ -PL, é inovadora e demonstrou sinergismo de efeitos e eficácia no tratamento de feridas.

Outros estudos *in vivo* também evidenciam as vantagens de associar hidrogeis de colágeno e quitosana para formulação de *scaffolds* no tratamento de feridas. O gel composto de colágeno/quitosana desenvolvido por Li e colaboradores (2019), apresentou bons resultados na cicatrização de feridas com aumento na taxa de cicatrização em menos tempo que outros tratamentos, quase completa após 14 dias. O composto aumentou o tecido de granulação, a deposição de colágeno e vascularização da ferida, também foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*.

Os hidrogéis contendo peptídeos recombinantes de colágeno conjugados com quitosana demonstraram resistência mecânica superior e maior viabilidade celular quando comparado aos hidrogéis apenas de quitosana. Além disso, promoveram infiltração celular, angiogênese e acelerou o processo de cicatrização de feridas no tratamento de queimaduras (DENG et al., 2020).

Em outro estudo conduzido por Tsai e colaboradores (2014), a utilização de NAC no tratamento de queimaduras em modelo experimental de ratos, demonstrou que NAC promove a cicatrização de feridas e acelera a re-epitelização. Além disso, o NAC induziu expressão colagenosa de MMP-1 importante no processo de reparação tecidual e remodelação. Os estudos citados corroboram com os achados desta pesquisa quanto à redução de células inflamatórias nas feridas tratadas com pré-gel bioconjugado com quitosana, NAC e ϵ -PL, bem como o aumento da vascularização quando comparados ao grupo controle e o colágeno comercial.

Nesta pesquisa, verificou-se que os efeitos esperados das combinações de pré-gel+quitosana+ NAC/ ϵ -PL foram similares aos referidos na literatura. O biomaterial colagenoso conjugado com quitosana e NAC/ ϵ -PL apresentou maior ação antibacteriana e acelerou o processo de cicatrização de feridas quando comparado aos grupos contendo o biomaterial sem NAC/ ϵ -PL e grupo controle. O fechamento das feridas, a redução de células inflamatórias no grupo tratado, bem como o aumento da vascularização indicam potencial promissor de ação do *scaffold* proposto para regeneração tecidual.

Contudo, é necessário avaliar os efeitos dos *scaffolds* em maior tempo experimental (14 a 21 dias) para verificar as etapas finais de proliferação celular e remodelamento tecidual.

6. CONCLUSÃO

Os *scaffolds* desenvolvidos neste estudo, tanto derivado de colágeno comercial quanto de biomaterial descelularizado e solubilizado (pré-gel), foram bioconjugados com quitosana e bioativos (NAC/ ϵ -PL). Estas formulações promoveram aumento da porosidade, são biocompatíveis, possuem ação antibacteriana, propriedade anti-inflamatória e foram capazes de auxiliar na regeneração tecidual de feridas de pele. Em conjunto, os dados desta pesquisa corroboram com a literatura científica quanto ao uso destas substâncias para potencializar a regeneração tecidual.

Os resultados obtidos poderão contribuir para a descoberta de novas terapias para a cicatrização de feridas, bem como possibilidades para o tratamento de outras patologias em que processos como a inflamação e a deposição de matriz extracelular, com consequente formação de tecido de granulação, ocorram de forma alterada. Novos estudos de caracterização e processamento deste biomaterial devem ser realizados para aprimoramento das propriedades do *scaffold* em futuras aplicações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIL, M.; AMIN, S. S.; MOHTASHIM, M. N-acetylcysteine in dermatology. **Indian Journal of Dermatology, Venereology & Leprology**, v. 84, n. 6, p. 652-659, 2018. DOI: https://doi.org/10.4103/ijdv.IJDVL_33_18
- ATKIN, L. Chronic wounds: the challenges of appropriate management. **British Journal of Community Nursing**, v. 24, n. Sup9, p. S26-S32, 2019. DOI: <https://doi.org/10.12968/bjcn.2019.24.Sup9.S26>
- AZAD, A. K.; SEMSINTHAM, N.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W. F. Chitosan membrane as a wound-healing dressing: Characterization and clinical application. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 69, n. 2, p. 216-222, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30000>
- AZEVEDO, M.; LISBOA, C.; RODRIGUES, A. Chronic wounds and novel therapeutic approaches. **British journal of community nursing**, v.25, n. Sup12, p. S26-S32, 2020. DOI: <https://doi.org/10.12968/bjcn.2020.25.Sup12.S26>
- BABU, M. Collagen based dressings—a review. **Burns**, v. 26, n. 1, p. 54-62, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(99\)00103-5](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(99)00103-5)
- BALSA, I. M.; CULP, W. TN. Wound care. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 45, n. 5, p. 1049-1065, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.04.009>
- BARBOSA, Matheus Carvalho. Avaliação e caracterização de matriz extracelular colagenosa descelularizada como implante subcutâneo em modelo murino. 2020. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C. T.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v 45, n. 4, p149-158, 1966.
- BESSA, L. J.; FAZII, P.; DI GIULIO, M.; CELLINI, L. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. **International wound journal**, v. 12, n. 1, p. 47-52, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/iwj.12049>
- BLASI, F.; PAGE, C.; ROSSOLINI, G.M.; PALLECCHI, L.; MATERA, M. G.; ROGLIANI, P.; CAZZOLA, M. The effect of N-acetylcysteine on biofilms: Implications for the treatment of respiratory tract infections. **Respiratory medicine**, v. 117, p. 190-197, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2016.06.015>

BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing—a review. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 104, n. 11, p. 3653-3680, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.24610>

BRETT, D. A review of collagen and collagen-based wound dressings. **Wounds**, v. 20, n. 12, p. 347-356, 2008.

CANESSO, M.C.C.; VIEIRA, A.T.; CASTRO T.B.R.; SCHIRMER, B.G.A.; CISALPINO, D.; MARTINS, F.S.; RACHID, M.A.; NICOLI, J.R.; TEIXEIRA, M.M.; BARCELOS, L.S. Skin Wound Healing Is Accelerated and Scarless in the Absence of Commensal Microbiota. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 10, p. 5171-5180, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400625>

CAO, J.; WANG, P.; LIU, Y.; ZHU, C.; FAN, D. Double crosslinked HLC-CCS hydrogel tissue engineering scaffold for skin wound healing. **International journal of biological macromolecules**, v. 155, p. 625-635, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.236>

CARMICHAEL, K.; HUGHES, J.; STYCHE, T. Impact of a wound management system on budget optimisation, formulary compliance and variations in care. **British Journal of Community Nursing**, v. 26, n. 5, p. 246-250, 2021. DOI: <https://doi.org/10.12968/bjcn.2021.26.5.246>

CARVALHO, D. N.; LOPEZ-CEBRAL, R.; SOUSA, R. O.; ALVES, A. L.; REYS, L. L.; SILVA, S. S.; OLIVEIRA, J. M.; REIS, R. L.; SILVA, T. H. Marine collagen-chitosan-fucoidan cryogels as cell-laden biocomposites envisaging tissue engineering. **Biomedical Materials**, v. 15, n. 5, p. 055030, 2020. <https://10.1088/1748-605X/ab9f04>

CHATTOPADHYAY, S.; RAINES, R. T. Review collagen-based biomaterials for wound healing. **Biopolymers**, v 101, 821–833, 2014.

CHEN, S.; HUANG, D.; LI, Y.; ZHOU, C. Recent advances in epsilon-poly-L-lysine and L-lysine-based dendrimer synthesis, modification, and biomedical applications. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 659304, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.6593>

CHHEDA A.H.; VERNEKAR M.R. A natural preservative ϵ -poly-L-lysine: fermentative production and applications in food industry. **International Food Research Journal**, v 22, n.1 ,23-30, 2015.

COSTA, F.; SOUSA, D. M.; PARREIRA, P.; LAMGHARI, M.; GOMES, P.; MARTINS, M. C. L. N-acetylcysteine-functionalized coating avoids bacterial adhesion and biofilm formation. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

CULLEN, B.; SMITH, R.; MCCULLOCH, E.; SILCOCJ, D.; MORRISON, L. Mechanism of action of PROMOGRAN, a protease modulating matrix, for the treatment of diabetic foot ulcers. **Wound Repair and Regeneration**, v. 10, n. 1, p. 16-25, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.2002.10703.x>

DAESCHLEIN, G. Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management. **International wound journal**, v. 10, n. s1, p. 9-14, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/iwj.12175>

DAS, S.; BAKER, A. B. (2016). Biomaterials and nanotherapeutics for enhancing skin wound healing. **Frontiers Bioengineering Biotechnology** v. 4, p. 82, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00082>

DE MOURA ESTEVÃO, L. R.; CASSINI-VIEIRA, P.; LEITE, A. G. B.; BULHÕES, A. A. V. C.; BARCELOS, L. S.; EVÊNCIO-NETO, J. Morphological evaluation of wound healing events in the excisional wound healing model in rats. **Bio-protocol**, v. 9, n. 13, p. e3285-e3285, 2019.

DENG, A.; YANG, Y.; DU, S.; YANG, X.; PANG, S.; WANG, X.; YANG, S. Preparation of a recombinant collagen-peptide (RHC)-conjugated chitosan thermosensitive hydrogel for wound healing. **Materials Science and Engineering: C**, v. 119, p. 111555, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111555>

DHOUIB, I.E.; JALLOULI, M.; ANNABI, A.; GHARBI, N.; ELFAZAA, S.; LASRAM, M. M. A minireview on N-acetylcysteine: an old drug with new approaches. **Life sciences**, v. 151, p. 359-363, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.003>

DINICOLA, S.; DE GRAZIA, S.; CARLOMAGNO, G.; PINTUCCI, J. P. N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review. **European Review for Medical Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 19, p. 2942-2948, 2014.

DODD A.; SWANEVELDER D.; ZHOU N.; BRADY D.; HALLSWORTH J.E.; RUMBOLD K. *Streptomyces albulus* yields ϵ -poly-L-lysine and other products from salt-contaminated glycerol waste. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**. v. 45, n. 12, p. 1083-1090, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2082-9>

EROSHENKO, D.; POLYUDOVA, T.; KOROBOV, V. N-acetylcysteine inhibits growth, adhesion and biofilm formation of Gram-positive skin pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 145-152, 2017.

EVELHOCH, S. R. Biofilm and chronic nonhealing wound infections. **Surgical Clinics**, v. 100, n. 4, p. 727-732, 2020.

GALIANO, R. D.; MICHAELS, V.J.; DOBRYANSKY, M.; LEVINE, J. P.; GURTNER, G. C. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound repair and regeneration**, v. 12, n. 4, p. 485-492, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x>

GARG, T.; RATH, G.; GOYAL, A. K. Biomaterials-based nanofiber scaffold: targeted and controlled carrier for cell and drug delivery. **Journal of drug targeting**, v. 23, n. 3, p. 202-221, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3109/1061186X.2014.992899>

GEORNARAS, I.; YOON, Y.; BELK, K. E.; SMITH, G. C.; SOFOS, J. N. Antimicrobial activity of ϵ -polylysine against *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in various food extracts. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 8, p. M330-M334, 2007.

GIL, E. S.; PANILAITIS, B.; BELLAS, E.; KAPLAN, D. L. Functionalized silk biomaterials for wound healing. **Advanced Healthcare Materials**, v. 2, n. 1, p. 206-217, 2013.

GOODARZI, P.; FALAHZADEH, K.; NEMATIZADEH, M.; FARAZANDEH, P.; PAYAB, M.; LARIJANI, B.; BEIK, A. T.; ARJMAND, B. Tissue engineered skin substitutes. **Cell Biology and Translational Medicine**, v. 3, p. 143-188, 2018. DOI: 10.1007/5584_2018_226

GRAVITZ, L. Skin. **Nature**, v. 563, p. S83. DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-018-07428-4>

GRAVES, N.; PHILLIPS, C. J.; HARDING, K. A narrative review of the epidemiology and economics of chronic wounds. **The British journal of dermatology**, v. 187, n.2, 141–148, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/bjd.20692>

GUERINI, Marta et al. Microstructured lipid carriers (MLC) based on N-acetylcysteine and chitosan preventing *Pseudomonas Aeruginosa* biofilm. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 891, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22020891>

GUO, J.; CAO, G.; WANG, X.; TANG, W.; DIWU, W.; YAN, M.; YANG, M.; BI, L.; HAN, Y. Coating CoCrMo Alloy with Graphene Oxide and ϵ -Poly-L-Lysine Enhances Its Antibacterial and Antibiofilm Properties. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 7249, 2021. <https://doi.org/10.2147/IJN.S321800>

HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. **Advances in therapy**, v. 34, n. 3, p. 599-610, 2017.

ISO 10993-5: 2009. **Biological evaluation of medical devices - part 5: tests for in vitro cytotoxicity**. International Organization for Standardization, Geneva. 2009.

IZADI, K.; GANCHI, P. Chronic wounds. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 32, n. 2, p. 209-222, 2005. <https://doi.org/10.3390/ijms17122085>

JONES, R. E.; FOSTER, D. S.; LONGAKER, M. T. Management of chronic wounds—2018. **Jama**, v. 320, n. 14, p. 1481-1482, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2018.12426>

KAFI, M. A.; AKTAR, M. K.; PHANNY, Y.; TODO, M. Adhesion, proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cell on chitosan/collagen composite scaffold. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, n. 12, p. 1-12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6341-8>

KALLIS, P. J.; FRIEDMAN, A. J. Collagen powder in wound healing. **Journal of drugs in dermatology**: JDD, v. 17, n. 4, p. 403-408, 2018.

KELLY, G. S. Clinical applications of N-acetylcysteine. **Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic**, v. 3, n. 2, p. 114-127, 1998.

KIM, C.; PARK, S. J.; YANG, D. H.; CHUN, H. J. Chitosan for tissue engineering. **Novel biomaterials for regenerative medicine**, p. 475-485, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2_25

KIMURA, S.; TSUJI, T. Mechanical and immunological regulation in wound healing and skin reconstruction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5474, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22115474>

LAN, X.; LIU, Y.; WANG, Y.; TIAN, F.; MIAO, X.; WANG, H.; TANG, Y. Coaxial electrospun PVA/PCL nanofibers with dual release of tea polyphenols and ϵ -poly (L-lysine) as antioxidant and antibacterial wound dressing materials. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 601, p. 120525, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120525>

LANDÉN, N. X.; LI, D.; STÅHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 20, p. 3861-3885, 2016. DOI: 10.1007/s00018-016-2268-0

LI, M.; HAN, M.; SUN, Y.; CHEN, G.; ZHANG, L. Oligoarginine mediated collagen/chitosan gel composite for cutaneous wound healing. **International journal of biological macromolecules**, v. 122, p. 1120-1127, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.061>

LI, X.; KIM, J.; WU, J.; AHAMED, A.; WANG, Y.; MARTINS-GREEN, M. N-Acetyl-cysteine and mechanisms involved in resolution of chronic wound biofilm. **Journal of diabetes research**, v. 2020, p. 1-16, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/9589507>

LIU, S.; LIU, X.; REN, Y.; WANG, P.; PU, Y.; YANG, R.; WANG, X.; TAN, X.; YE, Z.; MAURIZOT, V.; CHI, B. Mussel-inspired dual-cross-linking hyaluronic acid/ ϵ -polylysine hydrogel with self-healing and antibacterial properties for wound healing. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 12, n. 25, p. 27876-27888, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsami.0c00782>

MAYANDI, V.; CHOONG, A. C. W.; DHAND, C.; LIM, F. P.; AUNG, T. T.; SRIRAM, H.; DWIVEDI, N.; PERIAYAH, M. H.; SRIDHAR, S.; FAZIL, M. H. Y. T.; GOH, E. T. L.; ORIVE, G.; BEUERMAN, R. W.; BARKHAM, T. M. S.; LOH, X. H.; LIANG, Z.; BARATHU, V. A.; RAMAKRISHNA, S.; CHONG, S. J.; VERMA, N. K.; LAKSHMINARAYANAN, R. Multifunctional antimicrobial nanofiber dressings containing ϵ -polylysine for the eradication of bacterial bioburden and promotion of wound healing in critically colonized wounds. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 12, n. 14, p. 15989-16005, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsami.9b21683>

MENG, Zhen.; HE, Y.; WANG, F.; HANG, R.; ZHANG, X.; HUANG, X.; YAO, X. Enhancement of Antibacterial and Mechanical Properties of Photocurable ϵ -Poly-L-lysine Hydrogels by Tannic Acid Treatment. **ACS Applied Bio Materials**, v. 4, n. 3, p. 2713-2722, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01633>

MOREIRA, C.; CASSINI-VIEIRA, P.; DA SILVA, M.; BARCELOS, L. da. Skin Wound Healing Model - Excisional Wounding and Assessment of Lesion Area. **BIO-PROTOCOL**, v. 5, n. 22, e1661, 2015. DOI: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1661>

MUSTOE, T. A.; O'SHAUGHNESSY, K.; KLOETERS, O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 117, n. 7S, p. 35S-41S, 2006.

NIE, C.; SHEN, T.; HU, W.; MA, Q.; ZHANG, J.; HU, S.; TIAN, H.; WH, H.; LUO, X.; WANG, J. Characterization and antibacterial properties of epsilon-poly-L-lysine grafted multi-functional cellulose beads. **Carbohydrate Polymers**, v. 262, p. 117902, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117902>

OLSSON, M.; JARBRINK, K.; DIVAKAR, U.; BAJPAI, R.; UPTON, Z.; SCHUMIDTCHEN, A.; CAR, J. The humanistic and economic burden of chronic wounds: A systematic review. **Wound Repair and Regeneration**, v. 27, n. 1, p. 114-125, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/wrr.12683>

ORYAN, A.; SAHVIEH, S. Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1003-1011, 2017.

PATRULEA, V.; OSTAFE, V.; BORCHARD, G.; JORDAN, O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 417-426, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.08.004>

POWERS, J. G.; HIGHAM, C.; BROUSSARD, K.; PHILLIPS, T. Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 4, p. 607-625, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.08.070>

PURNA, S. K.; BABU, M. Collagen based dressings—a review. **Burns**, v. 26, p. 54–62, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(99\)00103-5](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(99)00103-5)

RAFAT, M.; LI, F.; FAGERHOLM, P.; LAGALI, N. S.; WATSKY, M. A.; MUNGER, R.; MARSUURA, T.; GRIFFITH, M. PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen–chitosan hydrogels for corneal tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, n. 29, p. 3960-3972, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.06.017>

RASHKI, S.; ASGARPOUR, K.; TARRAHUMOFRAD, H.; HASHEMIPOUR, M.; EBRAHIMI, M. S.; FATHIZADEH, H.; KHORSHIDI, A.; KHAN, H.; MARZHOSEYNI, Z.; SALAVATI-NIASARI, M.; MIRZAEI, H. Chitosan-based nanoparticles against bacterial infections. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, p. 117108, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117108>

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European surgical research**, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.

RICARD-BLUM, S. The collagen family. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 1, p. a004978, 2011.
DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>

RODRIGUES, B.; MORAIS, T. P.; ZAINI, P. A.; CAMPOS, C. S.; ALMEIDA-SOUZA, H. O.; DANDEKAR, A. M.; NASCIMENTO, R.; GOULART, L. R. Antimicrobial activity of Epsilon-Poly-L-lysine against phytopathogenic bacteria. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-68262-1

SAHANA, T. G.; REKHA, P. D. Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. **Molecular biology reports**, v. 45, n. 6, p. 2857-2867, 2018.
DOI: 10.1007/s11033-018-4296-3

SEN, C. K.; GORDILLO, G. M.; ROY, S.; KISNER, R.; LAMBERT, L.; HUNT T. K.; GOTTRUP, F.; GURTNER, G. C.; LONGAKER, M. T. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound repair and regeneration**, v. 17, n. 6, p. 763-771, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x>

SHIVAKUMAR, P.; GUPTA, M. S.; JAYAKUMAR, R.; GOWDA, D. V. Prospection of chitosan and its derivatives in wound healing: Proof of patent analysis (2010–2020). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 184, p. 701-712, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.086>

SHUKLA SC, SINGH A.; PANDEY A.K.; MISHRA A. Review on production and medical applications of ϵ -polylysine. **Biochem Eng.** v. 65, p.70–81, 2012.

SORG, H.; TILKORN, D. J.; HAGER, S.; HAUSER, J.; MIRASTSCHIJSKI U. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. **European Surgical Research**, v. 58, n. 1-2, p. 81-94, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1159/000454919>

SORUSHANOVA, A.; DELGADO, L. M.; WU, Z.; SHOLOGU, N.; KSHIRSAGAR, A.; RAGHUNATH, R.; MULLEN, A. M.; BAYON, Y.; PANDIT, A.; RAGHUNATH, M.; ZEUGOLIS, D. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. **Advanced materials**, v. 31, n. 1, p. 1801651, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>

SU, J.; LI, J.; LIANG, J.; ZHANG, K.; LI, J. Hydrogel preparation methods and biomaterials for wound dressing. **Life**, v. 11, n. 10, p. 1016, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/life11101016>

TAKEO, M.; LEE, W.; ITO, M. Wound healing and skin regeneration. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 1, p. a023267, 2015.

TSAI, M.; HUANG, H.; HSEU, J.; LAI, Y.; HSIAO, Y.; LU, F.; CHANG, H. Topical N-acetylcysteine accelerates wound healing in vitro and in vivo via the PKC/Stat3 pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 7563-7578, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms15057563>

VERLEE, A.; MINCKE, S.; STEVENS, C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydrate polymers**, v. 164, p. 268-283, 2017.

WANG, W.; MENG, Q.; LI, Q.; LIU, J.; ZHOU, M.; JIN, Z.; ZHAO, K. Chitosan derivatives and their application in biomedicine. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 2, p. 487, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21020487>

XU, R.; LUO, G.; XIA, H.; HE, W.; ZHAO, J.; LIU, B.; et al. Novel bilayer wound dressing composed of silicone rubber with particular micropores enhanced wound re-epithelialization and contraction. **Biomaterials**, v. 40, p. 1–11, 2015.

XUE, M.; JACKSON, C. J. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 3, p. 119-136, 2015.

YANG, Xu et al. Injectable and antibacterial ϵ -poly (l-lysine)-modified poly (vinyl alcohol)/chitosan/AgNPs hydrogels as wound healing dressings. **Polymer**, v. 212, p. 123155, 2021

ZHANG, L.; YIN, H.; LEI, X.; LAU, J.; YUAN, M.; WANG, X.; ZHANG, F.; ZHOU, F.; QI, S.; SHU, B.; WU, J. A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Effectiveness and Safety of Hydrogel Dressings in the Management of Skin Wounds. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 342, 2019.

ZHANG, M.; ZHAO, W.; FANG, Q.; WANG, X.; CHEN, C.; SHI, B.; ZHENG, B.; WANG, S.; TAN, W.; WU, L. Effects of chitosan-collagen dressing on wound healing in vitro and in vivo assays. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, v. 19, p. 2280800021989698, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1177/2280800021989698>

ZHAO, R.; LIANG, H.; CLARKE, E.; JACKSON, C.; XUE, M. Inflammation in chronic wounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2085, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17122085>