

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LAÍS FERNANDA MARQUES

Estabelecimento de um bioprocesso para produção e impressão 3D de um biogel resultante da associação de alginato, gelatina, PRP e prata.

RIBEIRÃO PRETO

2022

LAÍS FERNANDA MARQUES

Estabelecimento de um bioprocesso para produção e impressão 3D de um biogel resultante da associação de alginato, gelatina, PRP e prata.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

RIBEIRÃO PRETO

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação (CIP)
Ficha Catalográfica com dados inseridos pelo autor

Marques, Laís Fernanda.

Estabelecimento de um bioprocesso para produção e impressão 3D de um biogel resultante da associação de alginato, gelatina, PRP e prata / Laís Fernanda Marques. - São Paulo, 2022.

86 p.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, 2022.

Orientador: João Tadeu Ribeiro-Paes.

1. feridas crônicas. 2. biomateriais. 3. scaffold. 4. plasma rico em plaquetas. 5. medicina regenerativa. I. Universidade de São Paulo. Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Marques, Laís Fernanda

Título: Estabelecimento de um bioprocesso para produção e impressão 3D de um biogel resultante da associação de alginato, gelatina, PRP e prata.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho, bem como a sua apresentação em diversos congressos, foi realizado com o suporte financeiro das seguintes instituições e entidades:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Dedico este trabalho aos portadores de feridas crônicas, familiares e profissionais da saúde
que dedicam suas vidas levando alento ao próximo.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes, que além de excelente professor desde os tempos de graduação me ensinou que é possível conciliar a excelência sem abrir mão da sensibilidade e cuidado para com seus alunos.

Aos meus amados pais, Isabel Alves Marques e Jorge Agnelo Marques, cujos incontestáveis esforços me permitiram chegar a fase adulta e a seguir os valores de respeito, honestidade, justiça e lealdade.

A meus queridos irmão, George Agnelo Marques, Diorge Agnelo Marques e Antônia Marcelina Aragon, por serem meu suporte em momentos de forte angústia, me motivarem e confiarem integralmente em meu potencial.

A todos os professores que passaram em minha vida, contribuindo desde minha alfabetização até a aquisição de conhecimentos específicos, seja na graduação ou na pós.

Aos integrantes do Laboratório de Genética e Terapia Celular (GenTe Cel), em especial ao Caetano Pedro Evangelista Ribeiro, Marta Aparecida dos Santos Souza, Maria José Malagutti Ferreira, Vinícius Augusto Simões, Natália Cristine Dias dos Santos e Nemi Sabeh Junior, pelas contribuições acadêmicas e laços de amizade que se fortalecem ao longo da trajetória.

A todos os amigos da E.E. Porf. Carlos Alberto de Oliveira, em especial à Juliana Monteiro Beloto, Juliana Bonancea Sampaio, Hermínio Guilherme Bordin Neto, Henrique de Pontes Crepaldi, Ana Cristina Ignatti Vollet, Ana Carolina Pinezi Amendola, Carla Fernanda Camara e, não menos importante, ao pessoal da gestão Anália Neusa Duarte de Andrade Cordeiro, Carlos Alberto de Andrade Teixeira e Lucimar Ferreira, pela amizade, paciência e apoio.

Aos amigos-irmãos Nalva Priscila Marques Tomé, Paola Elizandra Simões Gasparini, Vivian Daiane do Nascimento, Josiane Marcondes, Gislaine Souza Rodrigues, Denise Paiva FRANCO, Thaís Helena da Motta Conceição, Vanessa Oliveira, Danilo Sacoman Hespanol, Gean Carlo Jangarelli, Patrícia Sacoman Hespanol, Raquel Sebrian Pereira e José Augusto da Silva Pontes Neto que, desde sempre, reconheceram e alimentaram a cientista que habita em mim.

Aos docentes e funcionários da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, *campus* de Assis, pela

disponibilização dos espaços e suporte durante a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
pela concessão da bolsa de estudos durante o período de vigência deste trabalho.

"Código de Financiamento 001"

“Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor,
estes três, mas o maior destes
é o amor.”

Primeira epístola de São Paulo aos Coríntios, 13:13.

RESUMO

Marques, L. F. (2022). Estabelecimento de um bioprocesso para produção e impressão 3D de um biogel resultante da associação de alginato, gelatina, PRP e prata. (Tese de Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Estima-se que em países desenvolvidos a taxa de feridas crônicas acometa entre 1 a 2% da população geral, representando, portanto, um ônus significativo para os sistemas de saúde, bem como morbidade e mortalidade. A medicina regenerativa (MR) tem por objetivo reparar ou substituir células, tecidos ou órgãos a fim de restaurar funções comprometidas. A associação entre as técnicas da MR bem como da engenharia tecidual, tem otimizado o desenvolvimento dos chamados biomateriais que colaboram para o reestabelecimento de tecidos nativos. A impressão tridimensional (3D) dos biomateriais permite a obtenção de constructos de tecidos e órgãos carreadores de moléculas bioativas ou células vivas. Considerando as propriedades de gelificação, baixa toxicidade, alta disponibilidade e baixo custo, a associação entre alginato e gelatina, amplamente empregados em engenharia de tecidos e bioimpressão, somados a secreção de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios liberados pelo plasma rico em plaquetas (PRP) e a pela atividade antibacteriana da prata, a associação entre alginato/gelatina/ PRP/prata configura uma biotinta com potencial aplicação em feridas crônicas de difícil cicatrização. O estabelecimento desse bioprocessos com impressão 3D de um biocurativo de baixo custo efetivo e reprodutibilidade apresenta forte potencial para que, futuramente, seja empregado como prática terapêutica em hospitais privados bem como no sistema único de saúde (SUS).

Palavras-chave: feridas crônicas, biomateriais, *scaffold*, impressão 3D, plasma rico em plaquetas, prata, engenharia de tecidos, medicina regenerativa, TERM.

ABSTRACT

Marques, L.F. (2022). Establishment of a bioprocess for the production and 3D printing of a biogel resulting from the association of alginate, gelatin, PRP and silver. (Tese de Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

It is estimated that in developed countries the rate of chronic wounds affects between 1 and 2% of the general population, representing, therefore, a significant burden for health systems, as well as morbidity and mortality. Regenerative medicine (RM) aims to repair or replace cells, tissues or organs in order to restore compromised functions. The association between RM techniques as well as tissue engineering has optimized the development of so-called biomaterials that collaborate for the reestablishment of native tissues. The three-dimensional (3D) printing of biomaterials allows obtaining tissue and organ constructs that carry bioactive molecules or living cells. Considering the gelling properties, low toxicity, high availability and low cost, the association between alginate and gelatin, widely used in tissue engineering and bioprinting, added to the secretion of growth factors and inflammatory mediators released by platelet-rich plasma (PRP) and the antibacterial activity of silver, the association between alginate/gelatin/PRP/silver configures a bioink with potential application in chronic wounds of difficult healing. The establishment of this bioprocess with 3D printing of an effective and reproducible low-cost biocurative presents strong potential for, in the future, to be used as a therapeutic practice in private hospitals and at the public health system (SUS).

Keywords: Chronic Wounds, Biomaterials, *Scaffold*, 3D Printing, Platelet Rich Plasma, Silver, Tissue Engineering, Regenerative Medicine, TERM.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Processo de obtenção do PRP

Figura 2. Esquema apresentando as diferentes etapas de desenvolvimento do trabalho.

Figura 3. Sangue total, primeira centrifugação, segunda centrifugação.

Figura 4. Representação dos grupos experimentais.

Figura 5. Obtenção do PRP.

Figura 6. Impressora tridimensional ZMorph 2.0 VX

Figura 7. Coleta do terço inferior correspondente ao PRP

Figura 8. Contagem dos elementos sanguíneos pelo método Rees-Ecker.

Figura 9. Obtenção das nanopartículas de prata.

Figura 10. *Scaffolds* obtidos pelo processo de manufatura aditiva.

Figura 11. Teste de porosidade por deslocamento de líquido.

Figura 12. Análise da esterilização por luz ultravioleta em fluxo laminar em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 45 e 60 minutos) após manutenção em cultura por 24h.

Figura 13. Análise da esterilização por luz ultravioleta em fluxo laminar em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 45 e 60 minutos) após manutenção em cultura por 48h.

Figura 14. Análise da esterilização por luz ultravioleta em fluxo laminar em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 45 e 60 minutos) após manutenção em cultura por 72h.

Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura. 1) Alginato/gelatina; 2) Alginato/gelatina/PRP.

Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura. 1) Alginato/gelatina/prata; 2) Alginato/gelatina/PRP/prata.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolos de obtenção do PRP com tempos e forças g propostos pelos autores.

Tabela 2. Protocolos de obtenção do PRP com tempos e forças g adequados às condições laboratoriais.

Tabela 3. Comparação das concentrações plaquetárias do PRP obtida por diferentes protocolos.

Tabela 4. Parâmetros hematológicos avaliados após isolamento do PRP

Tabela 5. Comparação da taxa de porosidade nos diferentes scaffolds obtidos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina Di-fosfato
Alg-Gel	Alginato-Gelatina
ANOVA	Análise de Variância (<i>Analysis of Variance</i>)
ASTM	<i>American Society for Testing Materials</i>
ATP	Adenosina Tri-fosfato
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (<i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i>)
bFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico básico (<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>)
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CAD	Modelagem Assistida por Computador (<i>Computer-Aided Design</i>)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
dECM	Matriz Extracelular Descelularizada (<i>Decellularized Extracellular Matrix</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
<i>E(pl)PRP</i>	Eficiência na Recuperação das Plaquetas no PRP
<i>E(pl)PS</i>	Eficiência na Recuperação do Plasma
EGF	Fator de Crescimento Epidermal (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
FC	Fator de Crescimento
<i>FCP</i>	Fator de Concentração Plaquetária
FCL	Faculdade de Ciências e Letras
FvW	Fator de Von Willebrand
<i>H</i>	Hematócrito

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF	Fator de Crescimento semelhante à Insulina (<i>Insulin-like Growth Factor</i>)
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro (RNA mensageiro)
MSC	Células Estromais Mesenquimais (<i>Mesenchymal Stromal Cells</i>)
<i>N(pt)PR</i>	Concentração Plaquetária no PRP
<i>P</i>	
<i>N(pt)ST</i>	Concentração Plaquetária no Sangue Total
<i>NL</i>	Concentração Leucocitária
<i>NPL</i>	Concentração Plaquetária
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	Tampão Fosfato Salino (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (<i>Platelet-derived Growth Factor</i>)
pH	Potencial Hidrogênio-iônico
PMP	Plasma Médio em Plaquetas
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PRP	Plasma Rico em Plaquetas (<i>Platelet-Rich Plasma</i>)
PS	Plasma Sobrenadante
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RP	Prototipagem Rápida (<i>Rapid Prototyping</i>)
SA	Alginato de Sódio (<i>Sodium Alginate</i>)
ST	Sangue Total

SUS	Sistema Único de Saúde
TE	Engenharia de Tecidos (<i>Tissue Engineering</i>)
TERM	Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos (<i>Tissue Engineering and Regenerative Medicine</i>)
TGF- β	Fator de Crescimento de Transformação beta (<i>Transforming Growth Factor beta</i>)
UA	Úlcera Arterial
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UPP	Úlcera por Pressão
UV	Úlcera Venosa
$V(pl)PRP$	Volume de Plasma Rico em Plaquetas
$V(pl)PS$	Volume de Plasma no Sobrenadante
$V(pl)ST$	Volume de Plasma no Sangue Total
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VST	Volume de Sangue Total

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos	19
1.2. Desenvolvimento histórico dos curativos e relevância para os dias atuais	21
1.3. Tecido Epitelial	24
1.3.1. Tipos de feridas	26
1.3.2. Feridas crônicas	27
1.4.1. Biomateriais	30
1.5. Impressão 3D	31
1.6. Alginato	32
1.7. Gelatina	34
1.8. Prata	36
1.9. Plasma rico em plaquetas	37
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivo geral	41
2.2. Objetivos específicos	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. Obtenção do PRP	42
3.2. Avaliação quantitativa dos componentes sanguíneos	45
3.3. Preparo do hidrogel de alginato/gelatina	48
3.4. Preparo da nanopartícula de prata	48
3.5. Associação das PRP à blenda polimérica	49
3.6. Impressão dos <i>scaffolds</i>	50
3.7. Porosidade	52
3.8. Teste de esterilização dos <i>scaffolds</i>	52
3.9. Microscopia eletrônica de varredura	53
3.10. Análise Estatística	53
3.11. Aspectos éticos	53
4. RESULTADOS	54
4.1. Obtenção do PRP	54
4.2. Avaliação dos Componentes do Sangue Total e PRP	56
4.3. Obtenção de nanopartículas de prata	59
4.4. Impressão dos <i>scaffolds</i>	60

4.5. Porosidade dos <i>scaffolds</i>	61
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÃO	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
8. ANEXO	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos

De acordo com dados preliminares da Rede de Aquisição e Transplante de Órgãos (OPTN - *Organ Procurement and Transplantation Network*) o número de órgãos transplantados nos EUA alcançou recorde pelo sexto ano consecutivo em 2018, totalizando 36.527 órgãos transplantados. No entanto, tal medida está longe de alcançar patamares necessários para cobrir as mortes diárias de pessoas à espera de transplantes, bem como a inclusão diária de novos pacientes a lista de espera. Ademais, segundo a Organização da Nações Unidas (ONU) estima-se o aumento de pessoas com idade igual ou superior a 60 anos, saltando de 302 milhões para mais de 366 milhões, entre os anos 2019 e 2030, o que requer medidas de saúde adicionais que garantam o envelhecimento acompanhado de qualidade de vida (DIXON, 2021).

Diante deste cenário, a medicina regenerativa (MR) tem por objetivo reparar ou substituir células, tecidos ou órgãos a fim de restaurar funções comprometidas em virtude de defeitos congênitos, doenças, traumas e/ou envelhecimento (DIECKMANN, *et al.*, 2010). Assim, o aprimoramento das técnicas em MR potencializa os cuidados de saúde do século XXI, uma vez que enriquece as opções terapêuticas que possibilitam a cura de doenças graves e deficiências (YAMADA, *et al.*, 2021).

Em consonância com a MR, a engenharia de tecidos (ET) teve o termo cunhado por Langer e Vacanti, em 1993, inicialmente definida como um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida ao desenvolvimento de substitutos biológicos, também chamados biomateriais, que restauram, mantêm ou melhoram a função dos tecidos. Logo, tanto a ET quanto a MR, são campos em franca ascensão em que as terminologias são, por vezes, equivocadamente alternadas. Embora ambas evoquem a restauração de funções, a MR consiste em um campo mais amplo e generalizado ao passo que a ET suscita a regeneração de tecidos endógenos

(KATARI, *et al.*, 2015). Desse modo, a crescente demanda pela substituição de órgãos e tecidos, bem como os avanços em MR e ET resultou na convergência de tais conhecimentos, atualmente referidos pelo acrônimo TERM, um campo multidisciplinar que compreende conhecimentos de biologia celular, biomecânica, nanotecnologia, química de polímeros, ciência de materiais, engenharia, bioinformática e ciências médicas aplicadas (MUZZIO, *et al.*, 2021).

Dentre as aplicações mais comuns de biomateriais encontram-se disponíveis no mercado implantes médicos tais como válvulas cardíacas, enxertos, articulações artificiais, ligamentos e tendões. Os métodos que promovem a cicatrização de tecidos humanos (incluindo suturas, cliques e grampos para fechamento de feridas e curativos solúveis) ou ainda a combinação de arcabouços para células e moléculas bioativas, bem como sondas moleculares, nanopartículas e biossensores capazes de detectar a presença e quantidade de substâncias específicas também se enquadram na classe dos biomateriais (NATIONAL INSTITUTE OF BIOMEDICAL IMAGING AND BIOENGINEERING, 2017).

O desenvolvimento e aprimoramento de técnicas inovadoras para obtenção de novos tecidos, em especial o epitelial, é imperativo frente à crescente demanda de pacientes portadores de feridas crônicas. A compreensão acerca das propriedades da matriz extracelular (MEC), componente essencial que circunda e confere ambiente físico para as células, tem guiado o desenvolvimento de biomateriais em TERM adequados para construção de arcabouços tridimensionais, geralmente poliméricos, também chamados *scaffolds* (BELLINI, *et al.*, 2015; MUZZIO, *et al.*, 2021). Assim, a MR segue o paradigma prevenir-protéger-promover visando a manutenção do bem-estar, o restabelecimento de formas e funções, bem como, em última análise, oferece a possibilidade de prolongar a vida livre de doenças (YAMADA, *et al.*, 2021).

1.2. Desenvolvimento histórico dos curativos e relevância para os dias atuais

Nos primórdios da civilização humana o estabelecimento bem-sucedido de povos primitivos ocorreu em diversas partes do mundo, cada qual ocupando áreas limitadas, regidos por cultura, desenvolvimento e avanço relativo próprios (TALUKDAR, DUTTA, 2020). Estima-se que o conhecimento médico acerca do tratamento de feridas tenha se desenvolvido a partir de quatro áreas principais: Mesopotâmia e Mediterrâneo Oriental, Extremo Oriente, Índia, América do Sul e Polinésia. Tais conhecimentos foram partilhados através das conquistas de Alexandre, o Grande, que viabilizou a comunicação entre Mesopotâmia, Egito, Grécia e Roma e entre a Grécia e a Índia (FORREST, 1982).

Na pré-história, boas condições físicas estavam diretamente ligadas à sobrevivência humana, uma vez que as tribos nômades partiam constantemente em busca de abrigo e alimentos. Nessa época, pessoas com alguma característica física que impedia ou limitava as atividades de caça ou forrageamento comprometiam todo grupo, de modo que, o cuidado ativo de membros acometidos acarretava benefícios ao clã como um todo (WESTPHALEN, 2020). Dessa forma, diversas práticas realizadas por povos primitivos, bem com o legado da medicina popular, têm fornecido o conhecimento sobre as práticas realizadas ainda em tempos longínquos (FORREST, 1982).

O acesso de populações antigas aos diferentes recursos disponíveis acarretou o emprego de uma ampla variedade de matérias de origem animal (bile, carne, clara de ovo, cochoilha, gordura, leite, manteiga, sangue, teia de aranha), vegetal (açúcar, cascas, corantes, ervas, frutas, folhas, mel, óleos, resinas, seiva, terebintina, vinho ou vinagre) ou mineral (alcatrão, argila, arsênio, antimônio e sais de alumínio, cobre, chumbo, mercúrio, potássio ou zinco, e piche). Folhas ou gramíneas eram usadas como ataduras e mandíbulas de formigas como sutura. Amputações rituais podiam eventualmente ocorrer, mas tal prática dava-se fundamentalmente com caráter punitivo (FORREST, 1982).

Na mesopotâmia, a argila era aplicada para o tratamento de feridas, remontando a 2500 a.C. Nessa época, as feridas eram higienizadas com água ou leite antes de serem revestidas com mel ou resina. A limpeza de feridas com vinho, vinagre, mel ou gordura perdurou pela Grécia antiga ao ser executada por Hipócrates em 460-370 a.C. Tal prática era seguida pelo emprego de lã fervida em vinho ou água como forma de curativo (DHIVYA, *et al.*, 2015).

No antigo Egito, as doenças e infecções eram atribuídas a deuses, demônios e espíritos. Assim, os tratamentos adotados incluíam drogas e matérias naturais associados a práticas de religião e magia, descritas em uma série de papiros médicos, datados de, aproximadamente, 1800 a.C. a 300 d.C. Os papiros médicos que mais se popularizaram datam da 18ª dinastia (1550-1295 a.C.), consistindo basicamente no relato de uma série de doenças com suas respectivas prescrições e/ou encantamentos. Tais papiros apontam a experiência dos antigos egípcios em terapia medicamentosa, bem como o conhecimento interno e externo de várias infecções e doenças tratados com pomadas, ataduras ou procedimentos cirúrgicos, com destaque para os papiros de Smith de conteúdo cirúrgico, principalmente traumas, e os de Ebers, com conteúdo geral e médico (JOHANSON, 2019).

Os egípcios aventaram que as feridas cobertas cicatrizavam mais rápido e elaboraram o curativo adesivo associando resinas a tiras de linho. Acredita-se que a prática do emprego de resinas possa ser atribuída ao fato de, além de preencher e selar a ferida de árvores, resinas como a mirra, ao exalar fragrância, proporcionava um efeito adicional para o tratamento de feridas fétidas. Há relatos, ainda, do emprego de resinas a misturas contendo mel e banha de porco. Dentre os minerais introduzidos no tratamento de feridas, o cobre obtido da malaquita e crisocola, inicialmente utilizado como sombra de olhos, passou a ser usado de maneira exitosa no tratamento de feridas por portar propriedades adstringentes e antissépticas. Compostos antibacterianos contendo mercúrio também foram empregados pelos egípcios (FOOREST, 1982).

Os avanços das técnicas antissépticas, bem como a administração de antibióticos contribuíram para o controle de infecção e queda da mortalidade, ainda no século 19. A adoção de curativos oclusivos, no final do século 20, passou a maximizar o processo de recuperação devido ao efeito de proteção ser

somado ao favorecimento do ambiente úmido por meio do contato contínuo com proteinases, agentes quimiotáticos, complemento e fatores de crescimento que, em geral, são perdidos em feridas expostas. Tais curativos favorecem ainda a reepitelização, síntese de colágeno e angiogênese, bem como a redução de processos infecciosos (DHIVYA *ET AL.*, 2015).

Contudo, apesar dos avanços quanto ao manejo de feridas, o envelhecimento da humanidade tem fomentado a necessidade de tratamento de úlceras crônicas que carecem de terapias eficazes e de baixo custo. Em países desenvolvidos a taxa de feridas crônicas acomete entre 1 e 2% da população geral, representando, portanto, um ônus significativo para os sistemas de saúde, bem como morbidade e mortalidade (NUSSBAUM, *et al.*, 2018; (AMBROGI, *et al.*, 2020). No Brasil, em 2019, a porcentagem de pessoas com idade igual ou superior a 65 anos representou 9,5% da população total, alcançando expectativa de vida de 76,6 anos para a população geral (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2020), representando, portanto, uma parcela significativa da população que requer cuidados.

Entre os principais acometidos, além de idosos, encontram-se também adultos não-ambulatoriais ou paralisados, incapazes de se auto cuidarem e/ou dementes. Algumas condições médicas como anemia falciforme, imunossupressão, comprometimento renal, doenças autoimunes, dermatológicas, ou complicações associadas à idade ou paralisia podem contribuir para a formação de feridas (NUSSBAUM *et al.*, 2018). Neste contexto, os curativos desempenham um papel muito importante ao conferir proteção temporária ao tecido danificado, evitando ou controlando infecções à medida em que propicia um ambiente adequado ao processo regenerativo (IQBAL, *et al.*, 2019; CHEN, *et al.*, 2020).

1.3. Tecido Epitelial

A pele, maior órgão do corpo humano, possui importantes funções no organismo ao atuar como barreira protetora, liberar suor, detectar sensações de frio, calor e pressão bem como impedir danos físicos, mecânicos, químicos e patogênicos (LIU, *et al.*, 2017). Histologicamente, a pele é constituída pela epiderme, de origem ectodérmica, e por um compartimento conjuntivo de origem mesodérmica denominado derme (Figura 1).

A epiderme é composta pelo epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, apresentando cinco camadas: basal ou germinativa (formada por células de intensa atividade mitótica alojadas na membrana, rica em células-tronco), espinhosa (com espessura variável, onde são encontrados os queratinócitos apresentando desmossomos e glicocálix responsáveis pela aderência celular), granulosa (com produção grânulos lamelares liberados entre os espaços intercelulares para promoção a impermeabilidade), lúcida (camada compacta de queratinócitos em pele espessa) e, por sua vez, a camada córnea (formada por células achatadas, mortas e sem núcleo repletas de queratina). Outros elementos celulares presentes na epiderme são os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merckel, com as respectivas funções de produção de melanina, processamento e apresentação de antígenos ao sistema imunológico e percepção tátil (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; MALAGUTTI e KAKIHARA, 2011).

A derme, separada da epiderme pela membrana basal, é constituída por tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos, células de defesas como macrófagos e leucócitos e terminações nervosas na região de contato com a epiderme (camada papilar). Na porção profunda da derme, o tecido conjuntivo adquire o aspecto mais denso, compondo a chamada derme reticular caracterizada, principalmente, pela abundância em fibras colágenas que conferem resistência e contenção do corpo (GAMBA *et al.*, 2016).

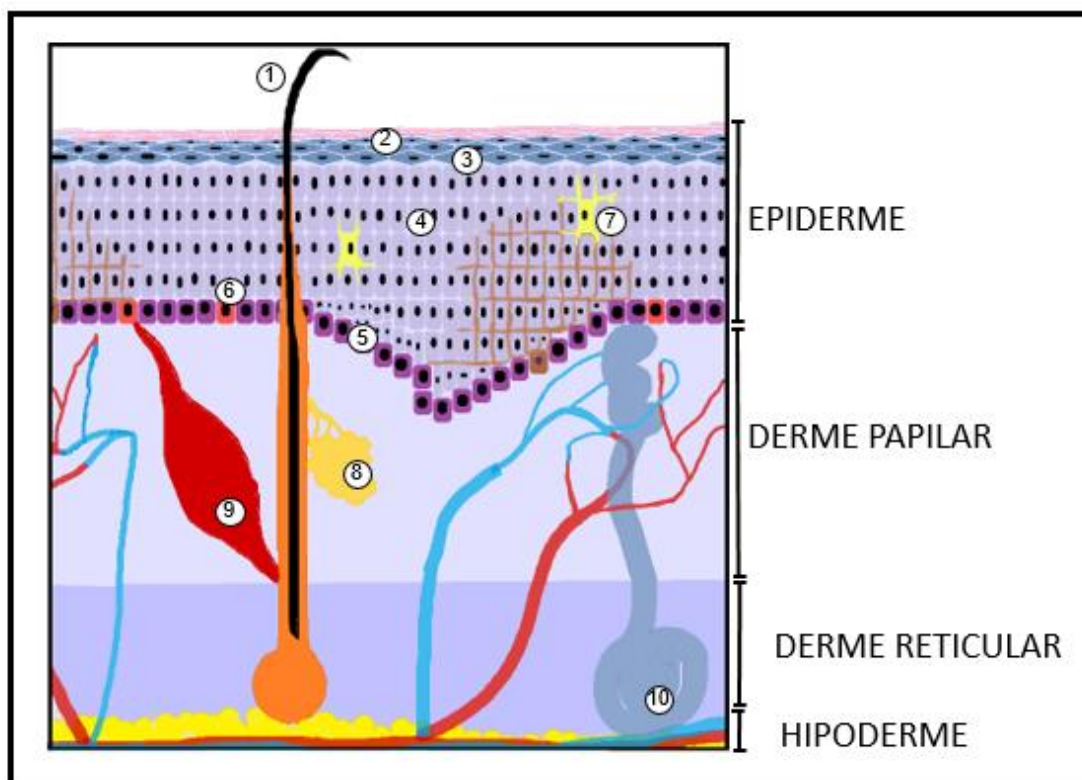


Figura 1. Estrutura da pele: 1) Pêlo; 2) Estrato córneo; 3) Estrato granuloso; 4) Estrato espinhoso; 5) Estrato basal; 6) Célula de Merkel; 7) Célula de Langerhans; 8) Glândula sudorípara; 9) Músculo eretor; 10) Glândula sebácea.

Ainda na derme, há a presença de anexos cutâneos tais como pelos, glândulas sebáceas e sudoríparas, mamas e unhas (GAMBA *et al.*, 2016; YILMAZ, *et al.*, 2021). O folículo piloso é constituído por um canal que o conduz ao exterior e na porção inferior possui grande quantidade de melanócitos que promovem coloração ao pelo. Outros anexos cutâneos como a glândula sebácea e a glândula sudorípara dos tipos apócrino e écrino, compõem também os anexos cutâneos (MALAGUTTI & KAKIHARA, 2011).

Antigamente a hipoderme, também chamada tela subcutânea ou panículo adiposo era considerada parte do tecido epitelial. Contudo, segundo a *Terminologia Anatômica*, de 2001, e a *Terminologia Histológica*, de 2008, a hipoderme trata-se de um compartimento à parte em relação à pele, correspondendo a fáscia superficial, seguida pela fáscia profunda e pelos

planos musculares e ósseos (GAMBA *et al.*, 2016).

A pele apresenta variações de espessura de acordo com a localização corporal variando entre 0,04 a 1,6 mm (pele fina) e maior que 1,6 a 5 mm (pele espessa) que recobre praticamente todo o corpo. Desse modo, a pele trata-se de um importante órgão de interface com o meio externo, onde a disposição dos queratinócitos em estratos com diferentes estágios de maturação na epiderme, bem como os elementos de sustentação de vasos sanguíneos e nervos na derme, a capacita a desempenhar importante papel na homeostase devido a intensa comunicação com os sistemas imunológico e nervoso (MALAGUTTI & KAKIHARA, 2011; GAMBA *et al.*, 2016; ROCHE & HARRIS-TRYON, 2021; BASU, *et al.*, 2022).

1.3.1. Tipos de feridas

As feridas podem ser causadas por agentes físicos, químicos ou biológicos, sendo caracterizadas pela ruptura estrutural e fisiológica do tegumento cutâneo, da membrana mucosa ou qualquer parte do corpo, variando em extensão e profundidade. As feridas superficiais são limitadas a epiderme, derme e hipoderme ao passo que as feridas profundas podem alcançar fáscias, músculos, aponeuroses, articulações, cartilagens, tendões, ligamentos, ossos, vasos sanguíneos e órgão cavitários (GEOVANI, 2014; MALAGUTTI, 2015; JIANG & RINKEVICH, 2021).

O comprometimento da pele normal, descrita como íntegra, lisa, elástica, sem brilho e sem sinais de alterações ou lesões (GEOVANI, 2014) pode se dar de maneira direta, por meio de alterações hormonais, ou indireta, através de estressores psicológicos negativos como como ansiedade, depressão e isolamento social e familiar (BASU, *et al.*, 2022).

Quanto à etiologia (figura 2), as feridas podem ser patológicas (causadas por fatores endógenos ou lesões secundárias a alguma doença de base), iatrogênica (resultantes de procedimentos ou tratamentos), intencionais ou cirúrgicas (feridas previsíveis causadas por necessidades terapêuticas), feridas

acidentais ou traumáticas (ocorrem inesperadamente) ou ainda causadas por fatores externos (queimaduras e úlceras por pressão). Quanto à evolução, as feridas são descritas como agudas quando respondem ao tratamento e cicatrizam sem complicações, ou crônicas, quando são de longa duração e com recidivas frequentes (GEOVANI, 2014; SORG & TILKORN, *et al.*, 2017).

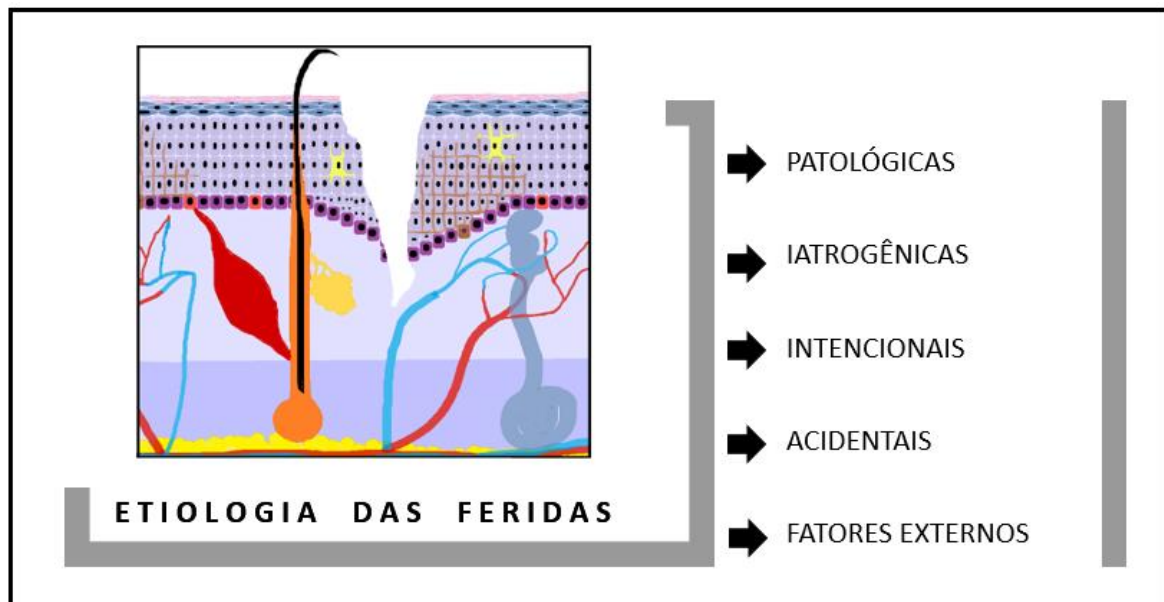


Figura 2. Etiologia das feridas

1.3.2. Feridas crônicas

As feridas crônicas são caracterizadas pelo prolongamento do processo inflamatório por período superior a três meses (LOU, *et al.*, 2021). Fatores como idade avançada, má nutrição e doenças sistêmicas tais como diabetes, insuficiência vascular e imunossupressão causam danos que comprometem a restauração das funções normais acarretando a dependência dos serviços de saúde (LIU, *et al.*, 2017; LOU *et al.*, 2021).

Além do ônus econômico, os portadores de feridas crônicas sofrem danos associados à autoimagem e limitações de interações sociais visto que, comumente, são estigmatizados devido a ruptura da pele, frequentemente, ser acompanhada de secreções e odores que alteram a imagem corporal (SALOMÉ, 2010; DOCKING *et al.*, 2018; BASU, *et al.*, 2022). Dentre as feridas crônicas de

maior relevância na prática clínica, destacam-se as úlceras venosas, arteriais, de pressão e o pé diabético, fortemente associadas a alta morbidade e mortalidade dos portadores (YU, *et al.*, 2022).

As úlceras venosas evoluem a partir de distúrbios fisiopatológicos, tais como a hipertensão venosa, varizes secundárias, edema e alterações tróficas. De origem espontânea, ou decorrentes de traumatismo, a UV apresentando-se como complicações tardias decorrentes de insuficiência venosa (RODRÍGUEZ *et al.*, 2017). As UV podem ser únicas ou múltiplas, ocorrendo frequentemente em membros inferiores, no terço distal da perna e proeminências ósseas, caracterizando-se, inicialmente, pela perda irregular do tecido superficial, podendo evoluir para lesões profundas de bordas definidas, geralmente com exsudato amarelo, presença de eczema, hiperpigmentação, edema, lipodermatoesclerose e eritema na região perilesional (MALAGUTTI, 2015; SEN, 2021).

As úlceras arteriais (UA) originam-se do bloqueio total ou parcial do suprimento arterial devido à inflamação e degeneração de grandes vasos saturados por placas de colesterol, células e tecidos degradados. As UA são ocasionadas por pequenos traumatismos sobre proeminências ósseas onde, geralmente, o leito da ferida fica demarcado com tecido necrosado. Pessoas acima de 45 anos de idade estão entre as principais afetadas, apresentando claudicação alternada que evolui para isquemia com agravamento da doença. Diferentemente das UV, as UA causam dor nos membros em repouso que costuma se intensificar quando o membro é elevado e diminuir quando o membro está pendente (MALAGUTTI, 2015).

As úlceras por pressão (UPP), também conhecidas como escaras, úlceras de decúbito ou feridas por pressão, ocorrem pela compressão prolongada ou pressão associada a cisalhamento e/ou fricção da pele e tecidos subjacentes, geralmente sobre uma proeminência óssea. Comum em pacientes acamados, apresenta maior frequência em idosos devido à diminuição da espessura da pele, das fibras elásticas e rigidez do colágeno. A redução do tecido adiposo subcutâneo, bem como dos capilares da derme, dificulta o suprimento sanguíneo e acarreta a desidratação que predispõe a ocorrência das UPP (MALAGUTTI,

2015; SOUZA, *et al.*, 2017). Estima-se que a prevalência de EPP varia de 8,8% a 29,9% em asilos e de 7,3% para 23% em hospitais em toda a Europa e América do Norte (DEMARRÉ, *et al.*, 2015; LOU, *et al.*, 2021; SEN, 2021).

Outra condição bastante frequente, o pé diabético, trata-se de uma complicação final do *diabetes mellitus*, que acarreta o surgimento de úlceras persistentes nos pés de aproximadamente 15 a 25% dos afetados (ARYA, 2014; STESSUK, *et al.*, 2016; LOU *et al.*, 2021). Proveniente de alterações biomecânicas que resultam em neuropatias, micro e macrovasculopatias, este tipo de úlcera apresenta predisposição a infecções e deformidades. Dentre os acometidos, 25% dos portadores desenvolvem feridas crônicas que, na ausência de tratamento adequado, resultam em amputações dos membros inferiores em 70-84% dos casos mais severos, onde há comprometimento de tecidos profundos ou se estende por membros inferiores (MALAGUTTI, 2015; MASSEE, *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2017; SCAIN, *et al.*, 2018). Estima-se que o manejo da úlceras diabéticas no sistema de saúde americano possa chegar a US \$ 13 bilhões por ano (RAGHAV, *et al.*, 2018).

Diante do exposto, verifica-se que as feridas crônicas representam um grave problema de saúde pública mundial devido ao elevado custo econômico e ao sofrimento dos portadores decorrente de dores, estresses psicológicos e prejuízos na qualidade de vida (CABRAL, *et al.*, 2018). Considerando que os tratamentos disponíveis são, muitas vezes, apenas paliativos, de modo a promover conforto, dignidade, alívio do sofrimento dos pacientes, faz-se necessária a busca por tratamentos inovadores que resultem em uma cicatrização de qualidade com vistas a prevenir a ocorrência de complicações ou recidivas (WOO, *et al.*, 2014; KOEHLER, *et al.*, 2018).

Neste cenário, o desenvolvimento de curativos modernos, baseados em biomateriais, desponta como alternativa promissora ao estimular respostas naturais de cura de tecidos nativos à medida que atua como barreira para instalação de infecções, fornece umidade adequada e controle de exsudato bem como possui propriedades mecânicas adequadas, possibilidade de associação a fármacos e componentes bioativo que modulam a atividade celular (LIN, *et al.*, 2019; YU, *et al.*, 2022).

1.4. Biomateriais

Atualmente, o enxerto autólogo é considerado padrão ouro para tratamento de pele, visto que evita a formação de cicatrizes e permite bom resultado estético e funcional. Contudo, o enxerto de pele autóloga é limitado pela disponibilidade de tecido, especialmente em pacientes queimados. Outra possibilidade, é o transplante de tecidos obtidos a partir de um doador saudável (um aloenxerto), limitada, no entanto, pela falta de tecido doador, potencial risco de infecção e rejeição do tecido, bem como pela baixa sobrevivência do enxerto (VYAS & UDYAWAR, 2019; NG, *et al.*, 2020). Ademais, a morbidade do local doador, hiperpigmentação e cicatrizes hipertróficas carecem de cautela (KOHLHAUSER, *et al.*, 2021).

Diante desta conjuntura os inúmeros trabalhos em TERM tem otimizado o desenvolvimento dos chamados biomateriais, que consistem em substâncias, de origem natural ou sintética, capazes de substituir, tratar ou recuperar tecidos, órgãos ou funções do corpo (DI MARZIO, *et al.*, 2020). Neste contexto, os biomateriais atuam como uma ponte entre agentes médicos e respostas naturais de cura promovendo a restauração funcional de tecidos nativos à medida que atua como arcabouço tridimensional que mimetiza a microestrutura de tecidos naturais, designados, frequentemente, como *scaffolds* (LIN, *et al.*, 2019). Ademais, a cicatrização de feridas crônicas enquanto questão desafiadora, tanto na clínica quanto na pesquisa científica, possui mercado voltado ao desenvolvimento de tratamentos avançados em franca expansão, alcançando o montante de US\$ 12 bilhões em 2020, com estimativa de alcançar US\$ 18,7 bilhões até 2027 (SEN, 2021).

Considerando a interação dos biomateriais com sistemas biológicos, para serem seguramente empregados na prática clínica, os biomateriais devem ser inertes, atóxicos, porosos, permissivos a adesão celular, biodegradáveis, com elasticidade adequada ao tecido em que é aplicado, hemocompatível e biocompatível, de modo a não ser reconhecido como corpo estranho pelo sistema imune do receptor. Por fim, outra propriedade importante, aborda o potencial de alguns biomateriais serem empregados como carreadores de

moléculas bioativas que ajudam no processo de recuperação do tecido em que é implantado (LIN, *et al.*, 2019; HERNANDEZ & REYES-ROMERO, 2019, YILMAZ, *et al.*, 2021).

Dentre os principais arcabouços empregados destacam-se os de origem sintética (ácido poliláctico e poliuretano) e os biológicos (obtidos de membranas biológicas como intestino, pericárdio bovino, membrana amniótica), reconhecidos pelo fornecimento de suporte mecânico e estabilidade, porém inertes (HINDERER, *et al.*, 2016). A terceira classe de biomateriais, conhecidos como naturais (alginato, quitosana, colágeno), embora estruturalmente mais fracos do que os citados anteriormente, apresentam a vantagem de estimular biologicamente as células e tecidos adjacentes (HERMETO, *et al.*, 2012; HINDERER, *et al.*, 2016). Ademais, os biomateriais naturais podem, ainda, ser empregados como biotinta para manufatura aditiva, também conhecida como impressão 3D, uma ferramenta bastante promissora em TERM.

1.5. Impressão 3D

A bioimpressão, também chamada biofabricação, consiste no processo de manufatura aditiva de produtos biológicos complexos a partir de unidades elementares, como células vivas e biomateriais carreadores de moléculas bioativas. A impressão tridimensional (3D) envolve de uma abordagem multidisciplinar, fazendo uso de princípios da TERM para a fabricação automatizada de constructos de tecidos e órgãos complexos e funcionais. (MOBARAKI *et al.*, 2020; LIM *et al.*, 2019).

A impressão tridimensional (3D) envolve de uma abordagem multidisciplinar, fazendo uso de princípios da engenharia e ciências biológicas para a fabricação de constructos de tecidos e órgãos. Tais estruturas, por sua vez, passam por depósito de materiais biológicos, bioquímicos e células vivas, tipicamente em uma camada por vez. Portanto, a bioimpressão consiste em um processo de manufatura aditiva que faz uso de biomateriais como microambientes para células vivas (MOBARAKI *et al.*, 2020).

Os processos de impressão 3D utilizam modelos digitais obtidos por meio de software de modelagem 3D ou dados obtidos de maneira digital. Os modelos são projetados em software de desenho, assistido por computador (CAD) e, posteriormente, convertidos em um STL (padrão tessellation language) para representar objetos em um formato tridimensional no sistema de coordenadas cartesianas (YILMAZ ET AL., 2021). Assim, possibilita a obtenção automatizada de materiais vivos com arquiteturas desejadas de forma precisa e reproduzíveis.

Para tanto, uma variedade de técnicas de manufatura aditiva foi adaptada nos últimos anos para biofabricação, incluindo bioimpressão no gotejamento de pequenas porções de material (*inkjet* ou jato de tinta), a bioimpressão por fotocura (impressão assistida por *laser*) do material a ser solidificado camada a camada e a baseada em extrusão, amplamente utilizada pela versatilidade e acessibilidade (MUNOZ., *et al.* 2016; KAČAREVIĆ *et al.* 2018; GU *et al.*, 2020; YILMAZ ET AL., 2021).

A bioimpressão por extrusão ocorre por meio da deposição contínua de biotintas viscosas pressionadas por um sistema de acionamento pneumático (ar comprimido), pistão (mecânico) ou parafuso conectado a um motor. Assim, a biotina passa por um extrusor, seringa ou orifício, depositando-se sobre determinado substrato (PATI *et al.* 2014; Ji & GUVENDIREN, 2017; JANG *et al.*, 2018). Em geral, as biotintas são selecionadas com base no tipo de aplicação, sendo, os polímeros, frequentemente adotados em função da disponibilidade e custo-benefício (YILMAZ ET AL., 2021).

1.6. Alginato

O alginato é um polissacarídeo que pode ser obtido de algas marrons ou bactérias dos gêneros *Azobacter* e *Pseudomonas*. Embora a obtenção por fermentação microbiana possua propriedades físico-químicas melhor definidas, o emprego limita-se a pesquisas em pequena escala por ser economicamente inviável para aplicações comerciais (SURTIMAN *et al.*, 2020). Por outro lado, o alginato do tipo ficocolóide, que compõe a parede celular e matriz extracelular de algas marrons, principalmente dos gêneros *Laminaria*, *Ecklonia*, *Macrocystis*,

Durvillea e *Macrocystis*, em virtude da abundância e facilidade de acesso tem sido amplamente empregados como biotintas.

O alginato consiste em copolímeros lineares de ácidos β -D manurônico (M) e α -L-gulurônico (G), associados por ligações 1,4 glicosídicas (*por fonte*), disponíveis como sal de sódio. A disposição aleatória, formando um heteropolímero MG ou ainda, dois homopolímeros MM e GG (Haug, 1964), confere diferentes propriedades dependendo da razão M/G (HAUG *et al.*, 1966; AUGUSTINE & RAJARATHINAM, 2012; HERNÁNDEZ-CARMONA, 2013).

A obtenção do alginato ocorre por meio de pré-tratamento ácido, seguido de extração alcalina, purificado por filtração a vácuo e recuperado como fibra insolúvel por precipitação com sais de cálcio. A conversão do alginato de cálcio em alginato de sódio é realizada por tratamento ácido, seguido de carbonato de sódio-etanol para obtenção de um produto que é desidratado, moído e então comercializado (HERNÁNDEZ-CARMONA, 2013).

A polimerização de alginato de sódio ou potássio em uma solução aquosa de íons de cálcio, frequentemente cloreto de cálcio (CaCl_2), permite a obtenção de produtos de amplo interesse industrial devido a elevada viscosidade que confere a formação de espessantes, estabilizadores, emulsificantes, aditivos, gelificantes e formadores de filmes. Assim, compostos derivados de alginato têm sido empregados em diferentes segmentos tais como de indústrias têxteis, alimentícios, cosmético, agrícola, bem como para de impressão material dentário e biocurativos (LESSER, 1947; MCHUGH, 1987; MANCINI *et al.*, 1996; AUGUSTINE & RAJARATHINAM, 2012; HERNÁNDEZ-CARMONA, 2013).

Declarado seguro a aplicações humanas pelo FDA (*Food and Drug Administration*), órgão regulamentador dos Estados Unidos, e acompanhado das propriedades gelificação, baixa toxicidade, alta disponibilidade e baixo custo, o alginato tem sido, portanto, empregado em TERM como matriz polimérica para cultivo celular, bem como para suporte ao processo regenerativo de células ósseas e epidérmicas (VERMA *et al.*, 2011; DE VOS *et al.*, 2014; BUENO *et al.*, 2015; XU e LAM, 2018; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2019).

Os curativos a base de alginato favorecem a umidade do microambiente no leito de feridas, promovendo o reparo de tecidos danificados, a medida em

que protege de infecções de origem microbiana (SWEENEY *et al.*, 2012; VARAPRASAD *et al.*, 2020). A capacidade de absorção do gel hidrofílico de alginato controla os exsudatos da ferida e reduz o risco de contaminação bacteriana, bem como acelera o processo de cicatrização por meio da ativação de macrófagos que produzem TNF- α que inicia os sinais inflamatórios (DHIVYA ET AL., 2015). Ademais a capacidade de absorver o excesso de exsudato auxilia na prevenção de maceração de tecidos adjacentes (DAUNTON, *et al.*, 2012).

O potencial terapêutico do alginato na dermatologia pode ainda ser maximizado pela associação a componentes bioativos ou fármacos uma vez que a estrutura porosa e semipermeável deste arcabouço protege as estruturas celulares associadas enquanto permite a difusão de nutrientes em modelos 3D, necessários à proliferação, migração e diferenciação celular (NAM & PARK, 2018; NEVES *et al.*, 2020). Além disso, o aprimoramento das técnicas de processamento, bem como a versatilidade do alginato de interagir com outros compostos poliméricos para obtenção de microesferas, biofilmes e *scaffolds* porosos, possibilitam diferentes formas de apresentação terapêutica deste polímero, seja como nanopartículas, nanotubos, microesferas, microcápsulas, esponjas, espumas, fibras ou hidrogéis (ADERIBIGBE & BUYANA, 2018; Li *et al.*, 2020; SEVERINO *et al.*, 2019; ASADI *et al.*, 2021; ZHAN *et al.*, 2021).

1.7. Gelatina

A disponibilidade e o baixo custo da gelatina, somada a vasta experiência de emprego nas indústrias e alimentícias farmacêuticas, têm tornado esta biomacromolécula forte candidata a biomaterial em engenharia de tecidos. Proveniente da hidrólise natural do colágeno, constituinte mais abundante da matriz extracelular, os sítios de reconhecimento celular da gelatina, como os peptídeos RGD, permitem a remodelação do tecido uma vez que, enquanto material biocompatível, a gelatina permanece estável *in vivo* (ZHANG, *et al.*, 2021).

O amplo emprego bem sucedido da gelatina para produção de cápsulas, administração e entrega de medicamentos ou genes, selantes

para próteses vasculares, curativos e absorventes para uso cirúrgico, tem evidenciado grande biocompatibilidade e biodegradabilidade, requisitos altamente desejáveis às aplicações em TERM (ÁVILA *et al.*, 2012; PIRES *et al.*, 2015).

A gelatina é uma proteína solúvel, obtida por meio de hidrólise ácida ou básica do colágeno ou desnaturação térmica da molécula, frequentemente, obtida de colágeno derivado da pele e estruturas ósseas de porcos e bovinos (SARKER *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2018; DUAN *et al.*, 2018). Ainda que possua origem xenobiótica, não há relatos de reações imunológicas ou alérgicas decorrentes do emprego deste material (JAYAKUMAR *et al.*, 2011; PAN *et al.*, 2016).

Apesar de possuir baixa resistência mecânica, o emprego da gelatina é de grande interesse devido a abundância de peptídeos que permitem melhor aderência de células e componentes funcionais empregados na produção de suportes (*scaffolds*) em TERM (DALLAN *et al.*, 2007). Além disso, a gelatina possui propriedades hemostática e pró-angiogênica, bem como influencia a ativação de macrófagos em feridas de modo a acelerar a regeneração tecidual a partir da síntese de colágeno no estágio inicial do processo de cicatrização (CHEN *et al.*, 2012; SAARAI *et al.*, 2013). Ademais, as fracas propriedades mecânicas da gelatina, podem ser superadas a partir da reticulação covalente com alginato, de modo a se obter uma blenda polimérica com propriedades adequadas para produzir *scaffold* usando bioimpressão 3D (UTRACKI, 2013; ERKOC *et al.*, 2020; KAKARLA *ET AL.*, 2021).

A apropriação das características físico-químicas e biocompatíveis, aliadas a capacidade de incorporação de células e compostos bioativos em uma matriz biodegradável, formando biotintas de amplo espectro, faz dos hidrogéis a classe de mais versátil e bem-sucedida entre os biocurativos (DAUNTON *et al.*, 2012). As diversas possibilidades de formulações das biotintas de hidrogéis possibilitam a preservação do tecido circundante ao local da lesão, facilitando o desbridamento por autólise do tecido necrosado enquanto previnem maceração em elevados níveis de exsudatos (JI & GUVENDIREN, 2017; CHEN *et al.*, 2018).

Assim, a associação de hidrogéis a outros componentes bioativos tende a maximizar o processo de regeneração de feridas crônicas. Considerando que o tal processo resulta da interação entre fatores de crescimento, sangue e matriz extracelular e que as citocinas impulsionam o processo de regeneração por meio do estímulo da produção de componentes da membrana basal, prevenção da desidratação e formação de tecido de granulação (DHIVYA *et al.*, 2015), isentos de contaminantes, o plasma rico em plaquetas (PRP) associado a nanopartículas de prata desponta como ferramenta promissora a ser somada os processos de manufatura aditiva.

1.8. Prata

A prata (Ag) é o metal mais reativo entre os metais nobres, sendo portanto, um dos mais bem conhecidos e valorizados pelo homem. As propriedades antimicrobianas dos íons de prata são conhecidas desde a antiguidade e as aplicações explorando tais potenciais foram consolidadas pelo emprego em próteses cirúrgicas e implantes dentários (AGOSTINHO & RAJARATHINAM, 2012; BESSA *et al* , 2020).

Em dermatologia, o emprego da prata enquanto agente antimicrobiano tem sido explorado para tratamento e prevenção de infecção de feridas. Devido aos múltiplos múltiplos sítios de ação antimicrobiana que cobrem amplo espectro de bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos, diversos medicamentos a base de prata tem sido desenvolvidos e disponibilizados no mercado, apresentados nas formas de espumas, hidrofibras e hidrocolóides (BESSA *et al* , 2020).

A ação antibacteriana da prata está bem estabelecida, e a atividade das formas iônicas, metálica e nanocristalinas deve-se a ligação dos íons prata a proteínas e ácidos nucleicos, bem como pelo estímulo a geração de espécies reativas de oxigênio que acarretam a perda da viabilidade de microorganismos contaminantes. Foi demonstrado ainda, que a prata inibe

atividade de todas as cepas bacterianas encontradas no leito de feridas crônicas, incluindo as espécies *Staphylococcus aureus* resistentes a metaciclina, bem como possui atividade antiinflamatória (TRIAL ET AL., 2010).

Diante destes aspectos, é crescente a quantidade de estudos que associem a prata a biomateriais de origem natural com potencial antimicrobiano limitado, de modo a potencializar os efeitos de biocurativos. Assim, a combinação de nanopartículas de prata no desenvolvimento de biomateriais naturais vai ao encontro da necessidade de disponibilizar curativos de fácil disponibilidade, baixo custo, biocompatíveis e bioativos. Tais curativos com propriedades de manutenção do ambiente úmido, bem como o controle adequado de exudatos e efeito antimicrobiano isento de citotoxicidade poderá representar um avanço significativo no manejo de feridas crônicas e de difícil cicatrização em sistemas públicos e particulares de saúde (JINTAKOSOL *et al.*, 2016; JAYARAMUDU & VARAPRASAD, *et al.*, 2017; LARSEN, *et al.*, 2018; CHEN, *et al.*, 2020).

1.9. Plasma rico em plaquetas

O organismo humano dispõe de um sistema hemostático altamente rápido e eficiente para controle de sangramento de lesões vasculares. Este sistema conta com agentes pró-coagulantes e coagulantes junto ao processo de fibrinólise que controlam a formação de coágulos extensos e os desfaz após o reparo do dano (HOFFBRAND & MOSS, 2013).

As plaquetas são estruturas citoplasmáticas medindo aproximadamente 2µm, formadas a partir da proliferação e diferenciação de células-tronco hematopoéticas em megacariócitos poliplóides que se fragmentam e as liberam em quantidades que variam entre 1.000 a 5.000 plaquetas por megacariócito. O organismo humano normal produz cerca de 1×10^{11} plaquetas por dia que podem permanecer viáveis por aproximadamente dez dias na corrente sanguínea, onde são amplamente recrutadas para manutenção da integridade

vascular (HOFFBRAND & MOSS, 2013; MARQUES *et al.*, 2014).

O principal agente regulador da produção plaquetária é a trombopoetina, sintetizada pelo fígado e rins, que opera aumentando o ritmo e a quantidade da produção de megacariócitos via receptor c-MPL. A concentração plaquetária limítrofe varia entre 150 a 4000.000/ μ L com valor de referência de 250.000/ μ L (HOFFBRAND & MOSS, 2013).

O plasma rico em plaquetas (PRP) consiste no aumento da concentração plaquetária superior aos níveis basais em um volume reduzido de plasma. Sob o ponto de vista terapêutico, o racional para o emprego do PRP consiste no reconhecimento de que as plaquetas atuam como reservatório de vários fatores de crescimento os quais levam a neoangiogênese e a cura de feridas tendo em vista a promoção do crescimento vascular e proliferação de fibroblastos que proporcionam aumento na síntese de colágeno e o desenvolvimento de tecido de granulação de melhor qualidade (MARX, 2001; VENDRAMIN, *et al.*, 2006; MARQUES *et al.*, 2014; SHARMA, *et al.*, 2018).

Dentre as diversas substâncias bioativas, destacam-se os fatores de crescimento (FC) PDGF (três isômeros PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\beta\beta$ e PDGF $\alpha\beta$), TGF (TGF β 1 e TGF β 2), VEGF, EGF, PF4, IL1, PDAF, PDEGF, ECGF, IGF, serotonina, dopamina, histamina, adenosina, cálcio, osteocalcina, osteonectina, fibrinogênio, fibronectina, trombospondina (TSP1), produzidos pelos grânulos plaquetários e secretados, após ativação das plaquetas, de modo a regular os aspectos fundamentais do reparo tecidual visto que atuam ativamente no processo inicial de cicatrização (VENDRAMIN *et al.*, 2006; FRANCO, *et al.*, 2012; MARQUES *et al.*, 2014; STESSUK, *et al.*, 2016).

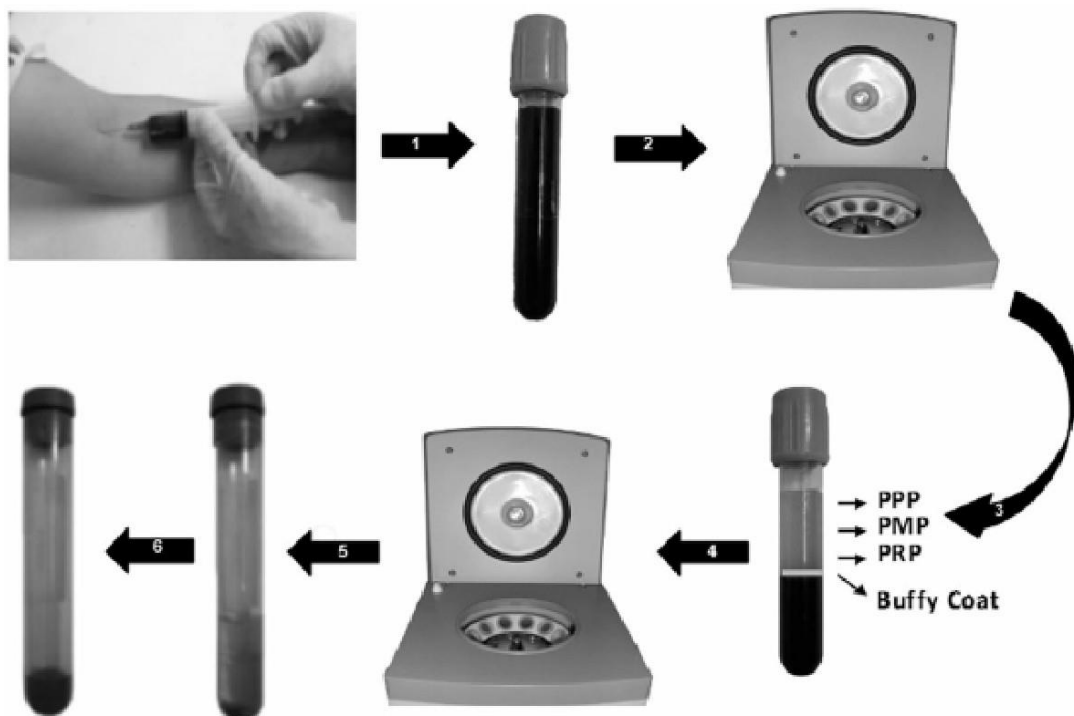


Figura 3. Processo de obtenção do PRP. 1) coleta do sangue venoso; 2) centrifugação do sangue total; 3) separação do plasma por gradiente de densidade em PPP (plasma pobre em plaquetas), PMP (Plasma médio em plaquetas), PRP, zona de névoa (*buffy coat*) e hemácias. 4) centrifugação do plasma; 5) descarte de dois terços do plasma da porção superior e 6) concentração máxima plaquetária correspondente ao terço inferior. Fonte: MARQUES *et al.*, 2014.

O PRP é um produto autólogo, portanto, totalmente isento do risco de contaminação cruzada, obtido por meio de duas centrifugações do sangue total seguido da coleta do terço inferior do plasma, correspondente ao PRP, conforme ilustrado na figura 1 (MARQUES *et al.*, 2014). Quando ativado com gluconato de cálcio a 10%, o PRP passa da forma líquida para a forma gel otimizando seu potencial biocurativo a ser empregado em úlceras crônicas.

Considerando o PRP é biocompatível, de fácil obtenção, baixo custo, bem como permissivo a adesão e proliferação celular sem originar subprodutos potencialmente tóxicos ou imunogênicos, o emprego deste como adjuvante associado a biomateriais desponta como promissor para emprego terapêutico, particularmente em úlceras crônicas de difícil cicatrização.

Diante do exposto, este projeto propõe que a obtenção de uma blenda polimérica composta de alginato, gelatina, PRP e prata, para produção de um *scaffold* via manufatura aditiva, consiste em uma ferramenta promissora a ser empregada no tratamento de feridas crônicas e de difícil cicatrização. Assim, foram comparados quatro grupos experimentais (Figura 4).

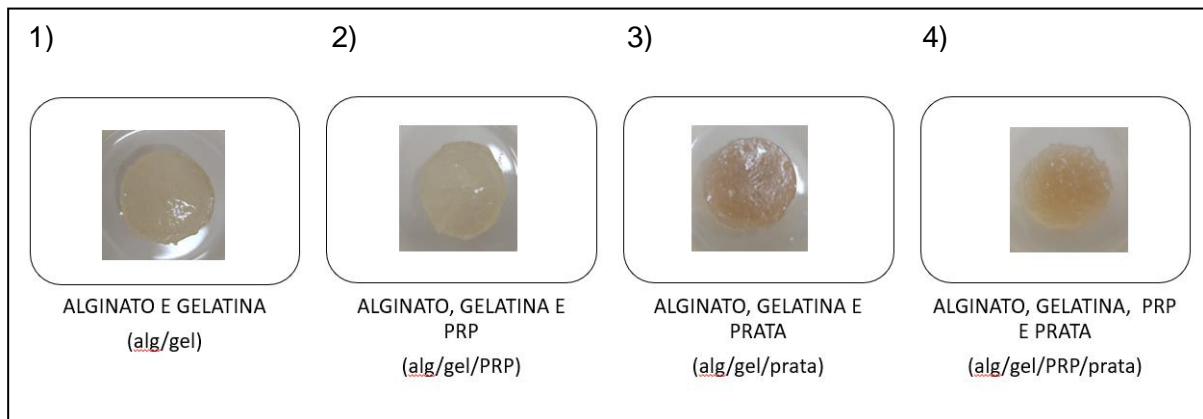


Figura 4. Representação dos grupos experimentais. 1) Alginato e gelatina; 2) Alginato, gelatina e PRP; 3) Alginato, gelatina e prata; 4) Alginato, gelatina, PRP e prata.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estabelecer um processo biotecnológico de manufatura aditiva de hidrogéis alginato/gelatina associados a Plasma Rico em Plaquetas e prata como uma nova alternativa para a produção de biocurativo bioativo.

2.2. Objetivos específicos

- Padronizar um protocolo para obtenção do PRP de sangue humano;
- Estabelecer uma metodologia de obtenção de *scaffold* de a base de alginato e gelatina;
- Estabelecer uma metodologia de obtenção de nanopartículas de prata;
- Associar o PRP e a prata à composição de diferentes biomembranas poliméricas;
- Padronizar a esterilidade dos *scaffolds* em luz ultravioleta;
- Automatizar a obtenção de *scaffolds* via impressão tridimensional por extrusão dos diferentes géis poliméricos;
- Comparar a porosidade dos *scaffolds* de cada grupo experimental;
- Realizar teste de microscopia eletrônica de varredura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção do PRP

O sangue foi obtido de doadores voluntários saudáveis (N=5), com faixa etária entre 21 e 33 anos (todos com sorologia negativa para HIV, Hepatite B, Hepatite C, Sífilis e doença de Chagas), por meio de punção venosa do antebraço, mediante concordância com a doação e uso do material biológico por meio de preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A). Cada voluntário colaborou com 16 mL de sangue (totalizando 14 mL para obtenção do PRP e 2 para realização do hemograma do sangue total), acondicionados em tubos do tipo vacutainer contendo 1 mL de anticoagulante citrato de sódio a uma concentração de 3,2% (volume de 4,5 mL) (*BD Bioscience, New Jersey, USA*). A cada sete mL, obteve-se 2 de PRP que foram lidos lidos/contados aonde?Descrever o equipamento, cada um, em triplicata, de modo a totalizar 30 amostras por grupo experimental.

O PRP foi preparado empregando-se a técnica de centrifugação do sangue total para a separação dos componentes sanguíneos por gradiente de densidade. Conforme apontado na Tabela 1, foram comparados os protocolos propostos por ANITUA, AMABLE *et al.* (2013) e FRANCO *et al.* (2012), bem como a proposição de um quarto protocolo empregando-se a menor força centrífuga (g) pelo menor tempo no primeiro processo de centrifugação, e a maior força g e maior tempo no segundo processo de centrifugação, dentre os protocolos selecionados (FRANCO *et al.*, 2012; AMABLE *et al.*, 2013; ANITUA *et al.*, 2016).

Tabela 1. Protocolos de obtenção do PRP com tempos e forças g propostos pelos autores.

Estudo	1ª centrifugação	2ª centrifugação
AMABLE <i>et al.</i> , 2013	300 g por 5 min	700 g por 17 min
ANITUA <i>et al.</i> , 2016	580 g por 8 min	-
FRANCO <i>et al.</i> , 2012	400 g por 10 min	800 g por 10 min
Marques	300 g por 5 min	800 g por 17 min

Fonte: Compilação da autora.

Considerando que a centrífuga empregada (*Excelsa® II - FANEM - Brasil*) não atingiu os valores exatos das forças g propostas pelos protocolos selecionados, foram utilizados valores próximos aos propostos, conforme apontado na Tabela 2, com aceleração de 50 rpm/s².

Tabela 2. Protocolos de obtenção do PRP com tempos e forças g adequados às condições laboratoriais.

Estudo	1ª centrifugação	2ª centrifugação
AMABLE <i>et al.</i> , 2013	302 g por 5 min	715 g por 17 min
ANITUA <i>et al.</i> , 2016	579 g por 8 min	-
FRANCO <i>et al.</i> , 2012	402 g por 10 min	788 g por 10 min
Marques	302 g por 5 min	788 g por 17 min

Fonte: Autoria própria.

O sangue total foi obtido por punção venosa em tubos à vácuo contendo 0,5mL de citrato de sódio (*Vacuplast*) na concentração de 3,2%, totalizando o volume de 8 mL de sangue por protocolo (Figura 5A). O sangue passou pelo primeiro processo de centrifugação de modo a se obter três porções distintas: o plasma na porção superior, os leucócitos (formando a chamada zona de névoa – *buff coat*, em inglês) e, por fim o concentrado de hemácias na porção inferior (Figura 5B).

O plasma obtido e a porção correspondente à zona de névoa foram transferidos para um tubo sem anticoagulante para a segunda centrifugação, exceto no protocolo proposto por ANITUA *et al.* (2016), o qual propunha apenas uma centrifugação (Figura 5C).

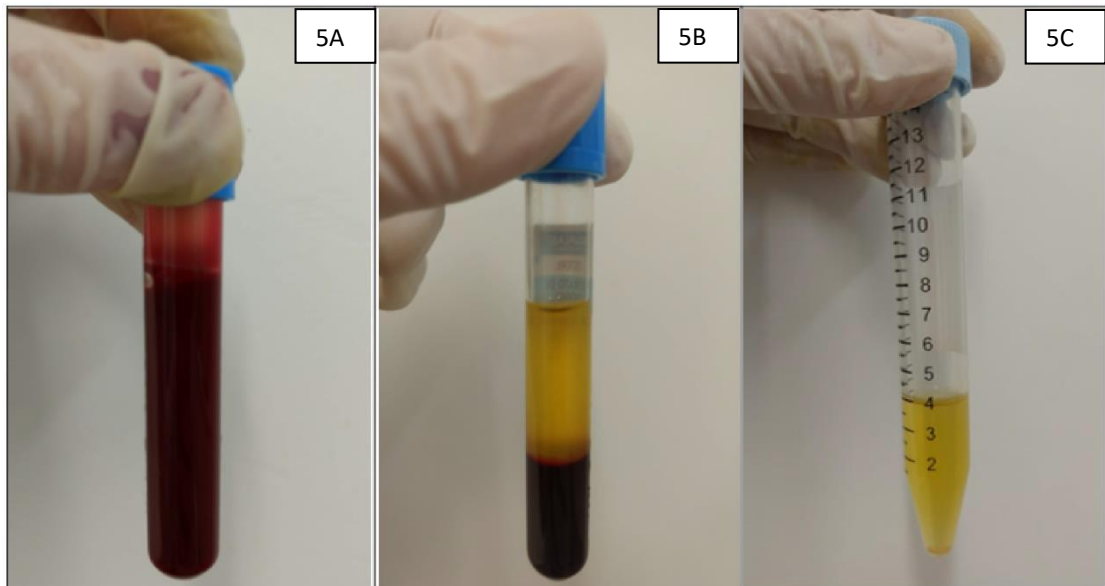


Figura 5. Obtenção do PRP. 5ª) Sangue total; 5B) Aspecto após primeira centrifugação; 5C) Plasma concentrado após a centrifugação.

Fonte: autoria própria.

Por fim, 1mL de terço inferior do fundo do tubo correspondente ao PRP, foi coletado e misturado com 0,1 mL do ativador plaquetário gluconato de cácio.

3.2. Avaliação quantitativa dos componentes sanguíneos

Os elementos sanguíneos foram quantificados a partir de contagem de leucócitos e plaquetas em momento anterior (sangue total) e posterior à dupla centrifugação (plasma concentrado), em câmara de *Neubauer*. Foi empregado o método direto de Rees-Ecker (*Êxodo Científica*[®], Hortolândia, SP, Brasil) para verificação da concentração plaquetária em microscópio óptico (modificado de REES & ECKER, 1923). Os valores de referência para a concentração plaquetária situam-se na faixa entre $1,5 \times 10^5$ e $4,5 \times 10^5$ plaquetas/mm³ de sangue ou $1,5 \times 10^8$ a $4,5 \times 10^8$ plaquetas/mL de sangue, com contagem de elementos no retículo central da câmara. A concentração plaquetária, em mm³ de amostra (sangue total ou PRP), pelo método de *Rees-Ecker*, é determinada pela relação seguinte, onde *NPL* (concentração plaquetária) representa o total de plaquetas contadas nos quadrados selecionados na câmara de *Neubauer*, conforme demonstrado na equação I:

$$\text{Plaquetas/mm}^3 = NPL \times 104 \quad (\text{I})$$

A avaliação quantitativa de leucócitos totais no sangue total e após o processamento foi realizada empregando-se solução de Türk (*Êxodo Científica*[®], Hortolândia, SP, Brasil). A concentração leucocitária por líquido de Türk é determinada pela equação II, onde *NL* representa o total de leucócitos por mm³ de amostra (sangue total ou PRP) contados nos quadrados maiores das extremidades da câmara de *Neubauer*. Os valores de referência concentram-se na faixa de 4×10^3 a 1×10^4 leucócitos por mm³ de sangue, ou 4×10^6 a 1×10^7 leucócitos/mL de sangue:

$$\text{Leucócitos/mm}^3 = NL \times 50 (\text{II})$$

De forma a verificar os efeitos da centrifugação diferencial sobre a concentração plaquetária após a separação plasmática, a eficiência na recuperação do plasma ($E(pl)PS$) foi mensurada, de acordo com a equação III.

$$E(pl)PS = \frac{V(pl)PS}{V(pl)ST} \times 100 \quad (III)$$

Na equação, $V(pl)PS$ representa o volume de plasma obtido após a centrifugação, correspondente ao plasma sobrenadante (PS), enquanto $V(pl)ST$ está associado ao volume de plasma no sangue total (ST), sendo determinado de acordo com a equação IV.

$$V(pl)ST = V_{ST} \times (1 - H) \quad (IV)$$

Na equação IV, V_{ST} é o volume de sangue total, no momento pré-centrifugação, e H representa o hematócrito (volume de eritrócitos).

De modo a avaliar e validar a eficácia da centrifugação na concentração plaquetária no PRP, a eficiência de recuperação das plaquetas ($E(pt)PRP$) foi determinada a partir da equação V.

$$E(pt)PRP = \frac{N(pt)PRP \times V(pl)PRP}{N(pt)ST \times V(pl)ST} \times 100 \quad (V)$$

A variável $N(pt)PRP$ expressa a concentração de plaquetas no PRP, $N(pt)ST$ a concentração de plaquetas no sangue total, e $V(pl)PRP$ expressa o volume de PRP após a centrifugação. O fator de concentração plaquetária (FCP) foi determinado a partir da relação entre a concentração de plaquetas no PRP e a concentração plaquetária no sangue total, definida pela equação VI.

$$FCP = \frac{N(pt)PRP}{N(pt)ST} \times 100 \quad (VI)$$

$$N(pt)ST$$

3.3. Preparo do hidrogel de alginato/gelatina

O hidrogel foi obtido a partir da mistura de de gelatina (*Sigma-Aldrich, Missouri, USA*) e alginato de sódio (*Sigma-Aldrich, Missouri, USA*) em tampão PBS (*LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil*). A gelatina foi devidamente pesada e solubilizada em PBS aquecido a 50°C em proporção de 8% m/v, e, posteriormente, foi armazenada sob resfriamento, em temperatura entre 10-15°C. O alginato de sódio foi pesado separadamente e dissolvido vagarosamente a uma proporção de 8% m/v em PBS, aquecido a uma temperatura de 50°C, mantendo-se a agitação constante parahomogeneização. A blenda polimérica foi obtida a partir da dissolução dos componentes vagarosamente homogeneizados, na porporção de 1:1.

3.4. Preparo da nanopartícula de prata

A solução de prata (*Sigma-Aldrich, Missouri, USA*) foi preparada segundo o método de redução química de acordo com a descrição de Lee e Meisel (AUGUSTINENE & RAJARATHINAM, 2012). A síntese de nanopartículas de prata ocorreu a partir da diluição de 50 mL de AgNO₃ 1mM, aquecido até a ebulição. Posteriormente, 5 mL de citrato trissódico (*Dinâmica, Santa Catarina, Brasil*) a 1% foi adicionado gota a gota e misturado vigorosamente. A solução foi aquecida até a mudança de cor ser evidente (amarelo claro). Em seguida, foi retirado o elemento de aquecimento e agitou-se em temperatura ambiente. A solução transparente incolor foi convertida para o amarelo pálido característico e, em seguida, para a cor vermelho-acastanhado, indicando a formação de nanopartículas de prata.

3.5. Associação das PRP à blenda polimérica

Após a homogeneização e resfriamento do hidrogel a (37°C), o material foi enriquecido com 1mL de PRP a cada 5cm² de área, seguindo a padronização previamente estabelecida por Stessuk (2016), e encaminhado ao processo de manufatura aditiva. Os grupos que receberam prata tiveram as o alginato e a gelatina diluídos na solução contendo as nanopartículas de prata e a adição do PRP ocorreu posteriormente, após o resfriamento.

3.6. Impressão dos *scaffolds*

As blendas alginato/gelatina, alginato/gelatina/PRP, alginato/gelatina/prata e alginato/gelatina/PRP/prata submetidas a manufatura aditiva seguindo o molde previamente definido em software (*escrever qual o software*). Para tanto, os diferentes géis poliméricos foram acondicionado em uma seringa e impresso em impressora tridimensional multifuncional do tipo extrusora Zmorph 2.0 VX (*ZMorph S.A., Vroclaw, Polônia*). O sistema de extrusão teve o bico adaptado com agulha hipodérmica de uso veterinário de dimensões 50x20 mm acoplada a uma seringa (Figura 6).

Os géis impressos foram depositados em plascas contendo discos de papel de filtro embebidos em solução aquosa de cloreto de cálcio CaCl_2 dihidratado (*Merck, Darmstadt, Alemanha*) a uma concentração de 2,0% m/v. Tal procedimento deu início ao processo de reticulação (*crosslinking* ou ligação cruzada das cadeias poliméricas) dos grupos químicos carboxila do alginato de sódio que não estavam ligados aos grupos amino do polímero de gelatina. A reticulação das camada superficiais dos hidrogéis ocorreu por meio de aspersão da solução de CaCl_2 2,0% m/v sobre o disco impresso.

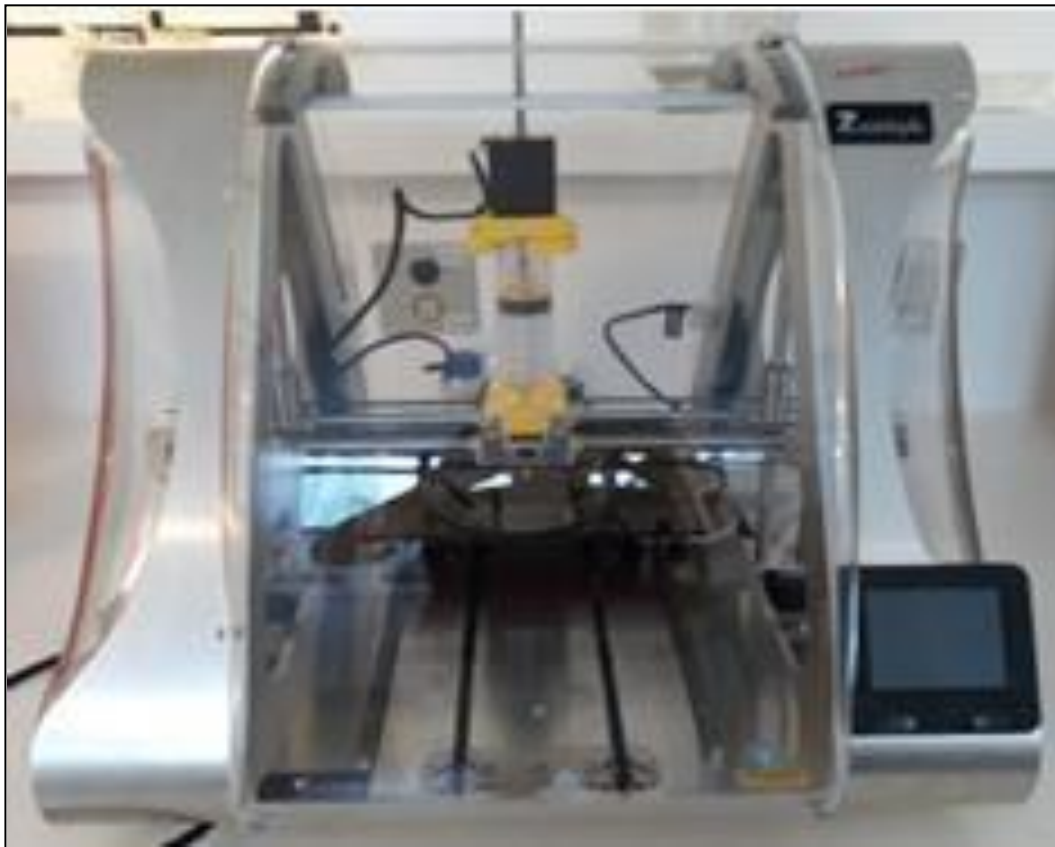


Figura 6. Impressora tridimensional ZMorph 2.0 VX do Laboratório de Genética e Terapia Celular (GenTe Cel) da Faculdade de Ciências e Letras – UNESP, *campus* de Assis.

3.7. Porosidade

A porosidade dos *scaffolds* foi medida pelo método de deslocamento de líquido. As amostras foram dispostas em tamanho de 1 cm×1 cm. Posteriormente, foram imersas em álcool etílico absoluto, para obtenção de V1 (Dinâmica, Santa Catarina, Brasil). Após 10 minutos, o álcool etílico havia adentrado os poros dos *scaffolds* de modo a cessar a produção de bolhas. Neste momento, o volume de álcool etílico (imersão do *scaffold*) foi registrado como V2. Posteriormente, as amostras imersas em álcool etílico foram retiradas e o volume restante foi registrado como V3. Foram testadas dez amostras de cada grupo experimental e a porosidade dos *scaffolds* (P) foi ser calculada usando a equação abaixo:

$$P = \frac{(V_1 - V_3)}{(V_2 - V_3)} \times 100\%$$

3.8. Teste de esterilização dos *scaffolds*

As amostras provenientes de cada grupo experimental foram dispostas sobre fluxo laminar sob luz ultravioleta (365 nm), equipado com lâmpada UV 15W. Foram observados os intervalos de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos. Transcorridos os devidos tempos de esterilização, triplicadas de cada amostra foram dispostas em meio ágar *Müller-Hinton (Kasvi[®], São José dos Pinhais, Brasil)* para detecção de possíveis contaminantes. As amostras foram mantidas em estufa incubadora a uma temperatura de 35°C, durante 72 horas. A contaminação das amostras por crescimento microbiano foi analisada em escala macroscópica, por observação dos aspectos morfológicos dos discos de hidrogel.

3.9. Microscopia eletrônica de varredura

As características microestruturais dos *scaffolds* foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. Para tanto, os *scaffolds* foram fixados com 2,5% de glutaraldeído (*Sigma-Aldrich, USA*), e imersos em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M (*Electron microscopy sciences, USA*) overnight. As amostras tratadas em tetróxido de ósmio 1% (*Electron microscopy sciences, USA*) foram desidratadas e secas em aparelho Baltec MED 020 (*Baltec, Balzers, Liechtenstein*). As amostras foram depositadas em ions de ouro e analisadas no microscópio eletrônico de varredura (*Jeol JSM -6610 LV, Tokyo, Japão*).

3.10. Análise Estatística

Para a verificação das diferenças significativas dos testes com quatro grupos experimentais foi utilizada a Análise de Variância de Kruskal-Wallis seguida do teste *Post Hoc* de Dunn – nível de significância de 5% (suposição de homocedasticidade não verificada para ANOVA paramétrica). Foi realizado intervalos de confiança de 95% para a média da concentração de plaquetas para cada um dos grupos experimentais. Todos os testes foram realizados utilizando o software *BioEstat5.0*.

3.11. Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências e Letras de Assis (FCL) – UNESP – Campus de Assis (Assis, São Paulo, Brasil), e protocolado com registro na Plataforma Brasil (CAAE 39644820.9.0000.5401). A pesquisa foi conduzida de acordo com os parâmetros legais, definidos na resolução nº 466, de 12 de Dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde. (ANEXO A).

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção do PRP

Objetivando a padronização de um protocolo de obtenção do PRP, foram comparados os protocolos de ANITUA *et al.* (2016), empregando ma única centrifugação, bem como os de AMABLE *et al.* (2013), de FRANCO *et al.* (2012) e o de Marques, empregando duas centrifugações (FRANCO *et al.*, 2012; AMABLE *et al.*, 2013; ANITUA *et al.*, 2016). A comparação entre os quatro diferentes grupos experimentais apontou o protocolo de FRANCO *et al.* (2012) como o mais eficiente para a concentração plaquetária, seguido dos protocolos e AMABLE *et al.* (2013) e Marques, sem diferença estatística e, pelo de ANITUA *et al.* (2016).

Tabela 3. Comparação das concentrações plaquetárias do PRP obtida por diferentes protocolos.

Estudo	Posto médio	Concentração plaquetária
AMABLE <i>et al.</i> , 2013	37.01* a	-
ANITUA <i>et al.</i> , 2016	87.20* b	2.4
FRANCO <i>et al.</i> , 2012	56.05* c	1.8
Marques	1.73	1.9

* postos médios seguidos de pelo menos uma letra igual (a, b ou c) não são estatisticamente significativos ($p > 0.05$).

A partir da análise do intervalo de confiança, pode-se verificar que o protocolo de ANITUA *et al.* (2016) forneceu a obtenção de um PRP cuja concentração plaquetária apresentou variação de valores alcançando concentrações plaquetárias inferiores aos níveis basais em algumas amostras e a valores superiores e outras, sendo, portanto, inadequado para as condições laboratoriais.

O protocolo de FRANCO *et al.* (2012) forneceu maior concentração plaquetária, sendo, portanto, adotado neste estudo, atingindo a concentração plaquetária 2.4 superior aos níveis basais; enquanto que os protocolos de AMABLE *et al.* (2013) e Marques forneceram concentrações de 1.8 e 1.9, respectivamente, não apresentando diferença estatisticamente significativa (Tabela 3). Em todos os protocolos 1 mL do terço inferior correspondente ao PRP foi coletado (Figura 7), de modo a evitar a coleta dos leucócitos decantados no tubo.



Figura 7. Coleta do terço inferior correspondente ao PRP.

Fonte: autoria própria.

4.2. Avaliação dos Componentes do Sangue Total e PRP

A análise feita por meio de contagem manual seguindo a metodologia de *Rees-Ecker* (Figura 8), possibilitou a verificação de cada constituinte sanguíneo, bem como evitou a possibilidade de contaminação inerente ao procedimento de contagem automática (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros hematológicos avaliados após isolamento do PRP

Parâmetro	H	NPTST	NPTPRP	VST	VPLPS	VPLST	VPLPRP
(Unidade)		(10⁸/mL)	(10⁸/mL)	(mL)	(mL)	(mL)	(mL)
Média	0,35±0,3	5,11±2,3	15,51±1,9	4	1	2,3±0,11	0,2

H = Hematócrito; NPTST = Concentração Plaquetária no sangue total; NPTPRP = Concentração Plaquetária no PRP; VST = Volume de Sangue Total; VPLPS = Volume de Plasma no Sobrenadante; VPLST = Volume de Plasma no Sangue Total; VPLPRP = Volume de PRP após a 2ª centrifugação.

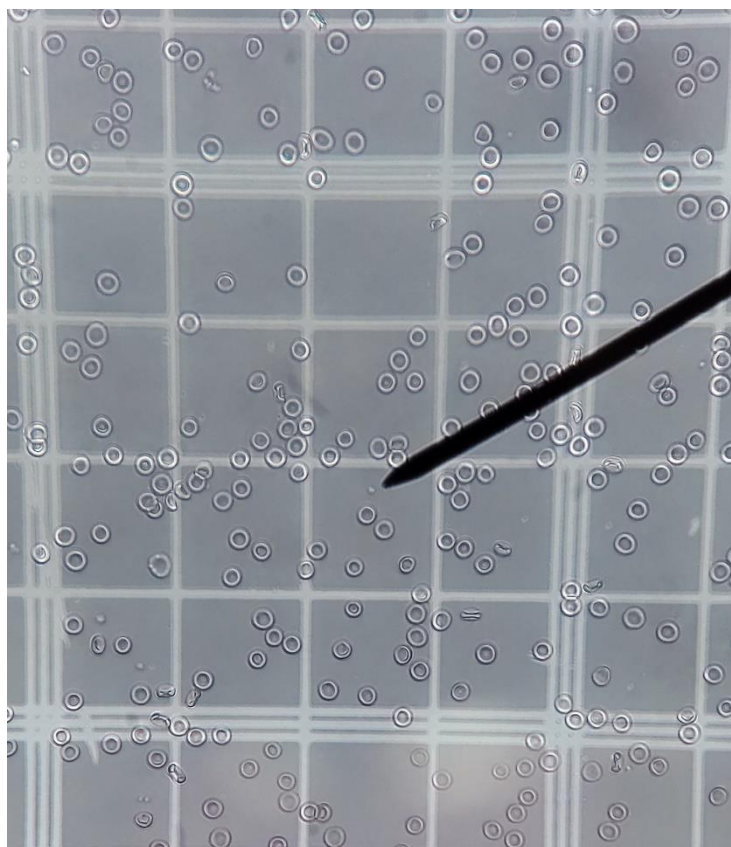
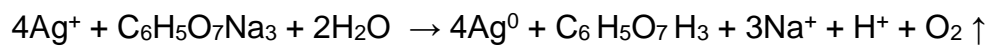


Figura 8. Contagem dos elementos sanguíneos pelo método Rees-Ecker.

4.3. Obtenção de nanopartículas de prata

Conforme descrito por AUGUSTINENE & RAJARATHINAM, a síntese de nanopartículas de prata deu-se pelo processo de redução, representado pela equação:



A conversão da solução incolor para amarelo pálido característico e, em seguida, para vermelho-acastanhado, indicou a formação de nanopartículas de prata (Figura 9).

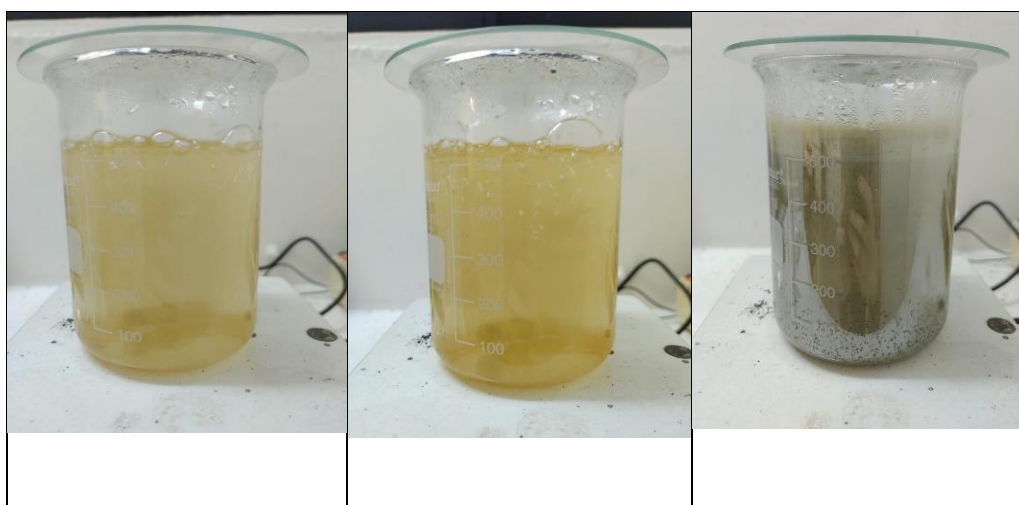


Figura 9. Obtenção das nanopartículas de prata.

4.4. Impressão dos *scaffolds*

Diferentes configurações de impressão, tais como número de camadas, infiltração e profundidade foram comparadas, de modo que a configuração 4C C100 P100 mostrou-se mais adequada para a obtenção das diferentes blendas poliméricas destinadas ao tratamento de úlceras cutâneas. Assim, a figura abaixo os diferentes *scaffolds* obtidos em quatro camadas, com profundidade e infiltração totais (Figura 10)

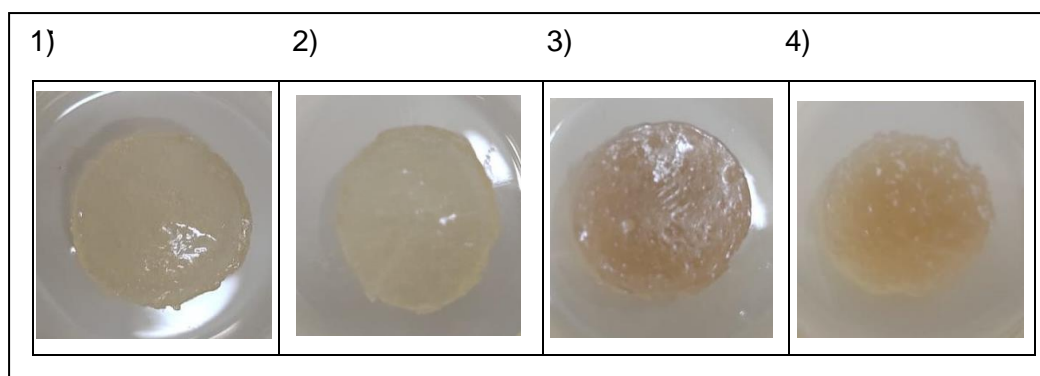


Figura 10. *Scaffolds* obtidos pelo processo de manufatura aditiva. 1) Alginato/gelatina; 2) Alginato/gelatina/PRP; 3) Alginato/gelatina/prata; 4) Alginato/gelatina/PRP/prata.

4.5. Porosidade dos *scaffolds*

A taxa de porosidade aferida em cada grupo pelo método de deslocamento de líquido a partir da liberação das bolhas aprisionadas no interior dos poros, de cada grupo experimental, permitiu verificar que os grupos contendo prata possuíam menor número de poros, conforme a Tabela 5 e Figura 11.

Tabela 5. Comparação da taxa de porosidade nos diferentes *scaffolds* obtidos.

Grupo experimental	Média	Desvio padrão
Alginato/gelatina	31,2	±2,6
Alginato/gelatina/PRP	29,4	±2,0
Alginato/gelatina/prata	12,02	±3,5
Alginato/gelatina/PRP/prata	18,21	±3,7

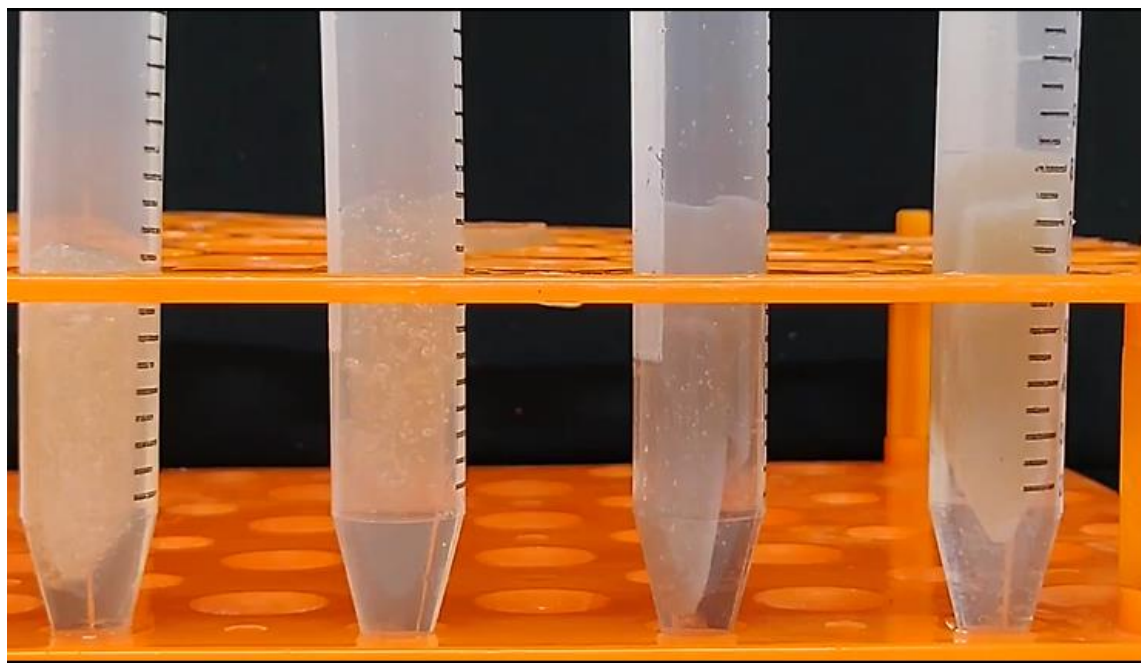


Figura 11. Teste de porosidade por deslocamento de líquido. É possível observar a liberação das bolhas de ar aprisionadas devido ao preenchimento dos poros com álcool etílico. 1) Alginato/gelatina; 2) Alginato/gelatina/PRP; 3) Alginato/gelatina/prata; 4) Alginato/gelatina/PRP/prata.

4.6. Teste de esterilização

Os hidrogéis com maior tempo de exposição a luz ultravioleta se mantiveram livres de contaminação por um período de tempo maior. Contudo, o aumento do tempo fez com que as amostras passassem a ter aspecto ressecado. A incubação em estufa manteve a temperatura constante de 37°C, simulando situação fisiológica do leito da ferida, favorável à contaminação microbiológica. Assim, o crescimento de microorganismos foi diretamente proporcional ao tempo em que as amostras foram mantidas em estufa, exceto pelos grupos contendo prata, em que não houve evidencia de contaminação. É possível observar o padrão de contaminação ao longo de 24 horas, 48 horas e 72 horas (Figuras 12, 13 e 14).


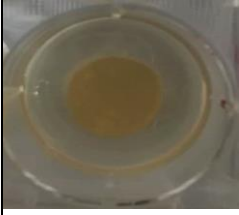
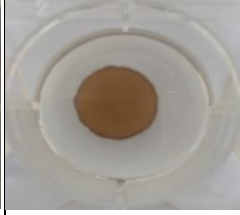
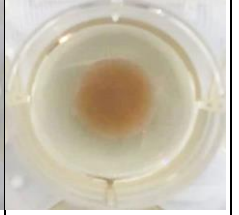

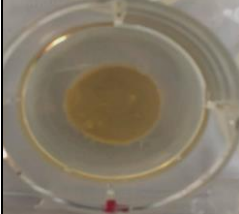
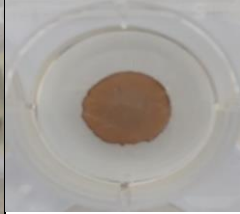
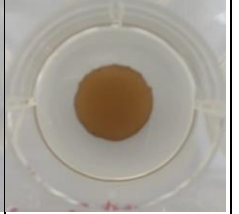
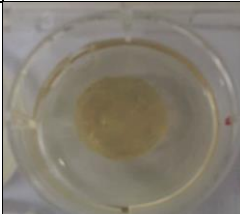
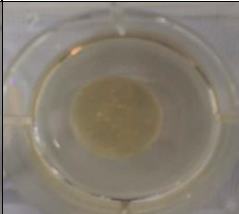


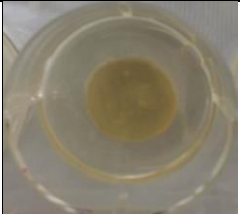



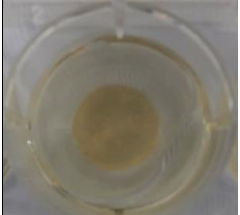
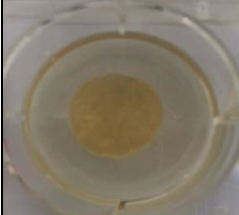
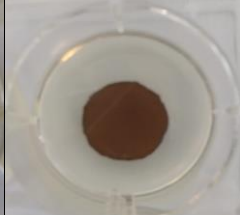
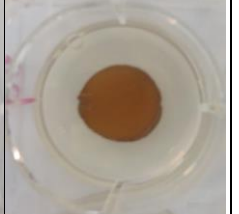
24h	Controle	PRP	Prata	PRP + Prata
T0				
T15				
T30				
T45				
T60				

Figura 12. Análise da esterilização por luz ultravioleta em fluxo laminar em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 45 e 60 minutos) após manutenção em cultura por 24h.

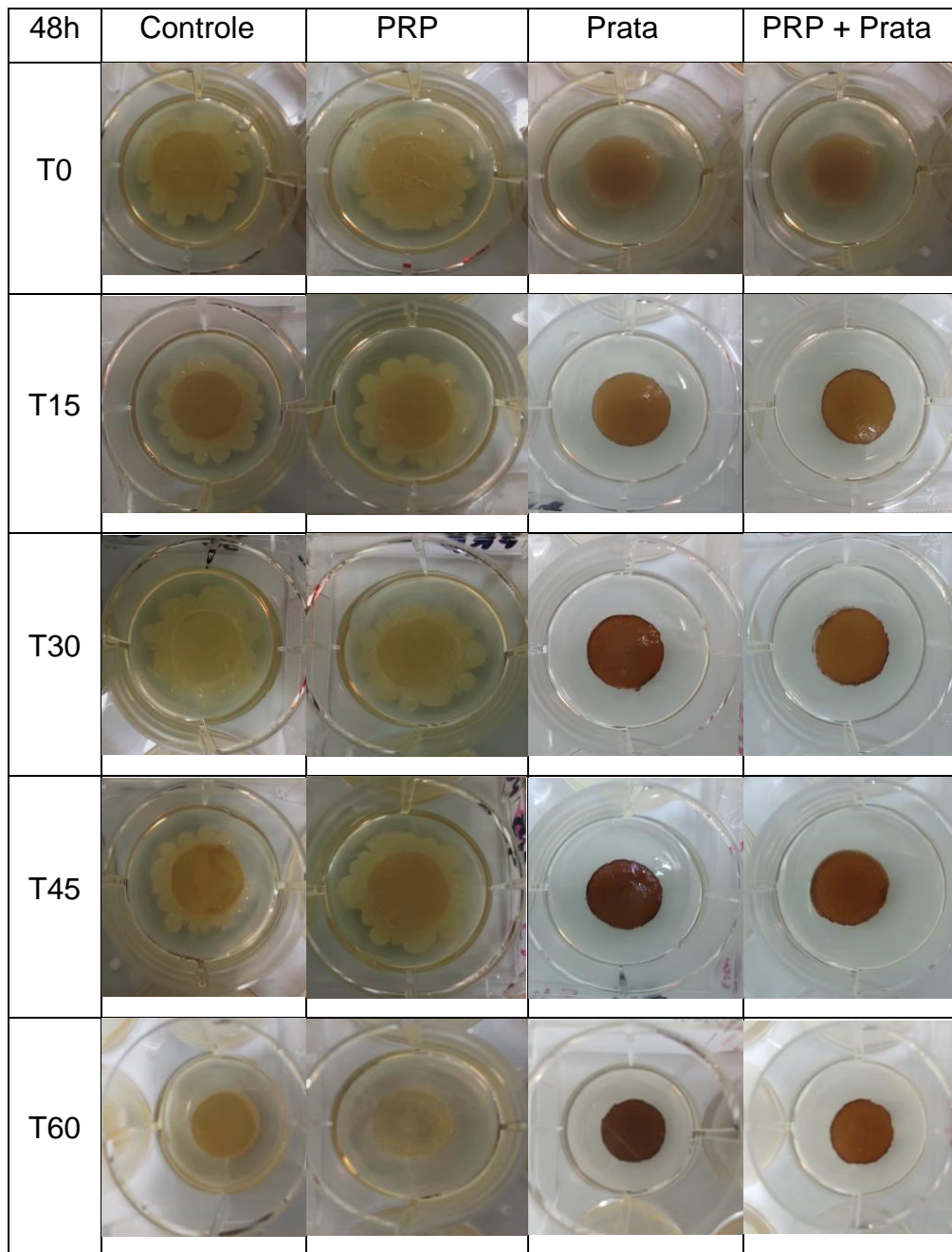


Figura 13. Análise da esterilização por luz ultravioleta em fluxo laminar em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 45 e 60 minutos) após manutenção em cultura por 48h.

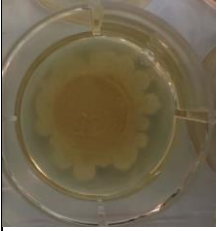
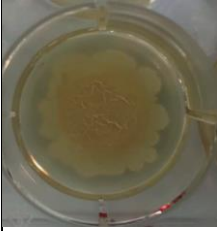
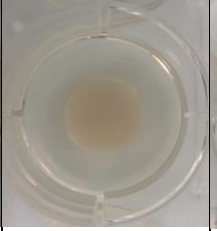


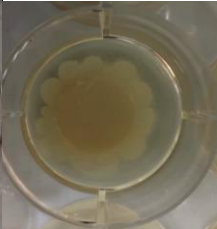
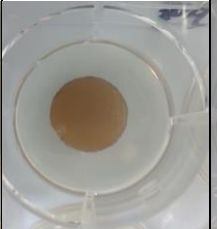
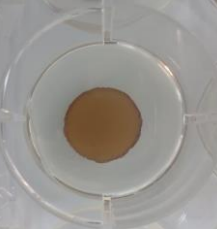

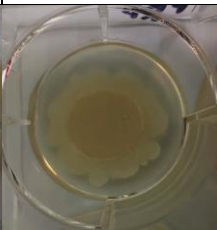


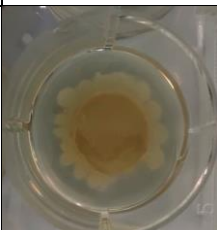
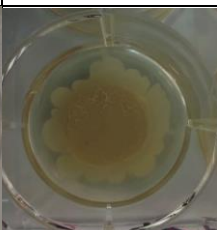


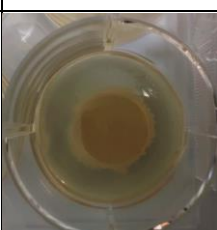
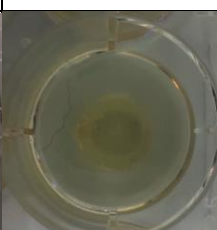


72h	Controle	PRP	Prata	PRP + Prata
T0				
T15				
T30				
T45				
T60				

Figura 14. Análise da esterilização por luz ultravioleta em fluxo laminar em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 45 e 60 minutos) após manutenção em cultura por 72h.

4.7. Microscopia eletrônica de varredura

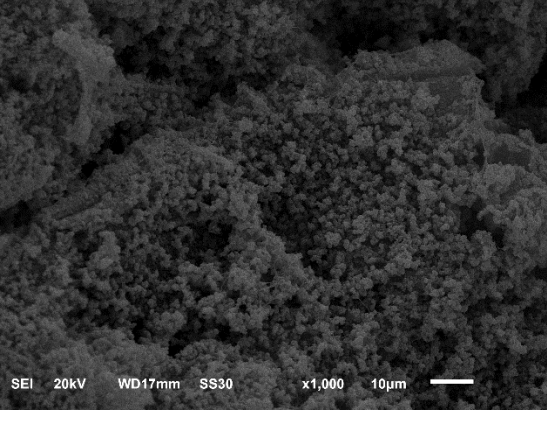
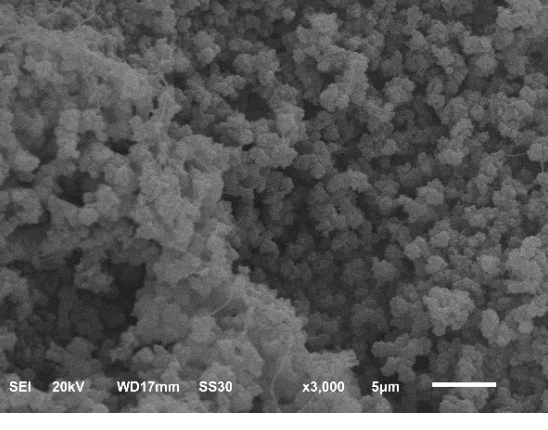
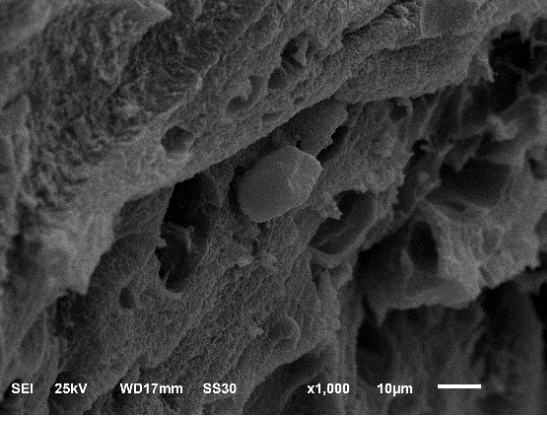
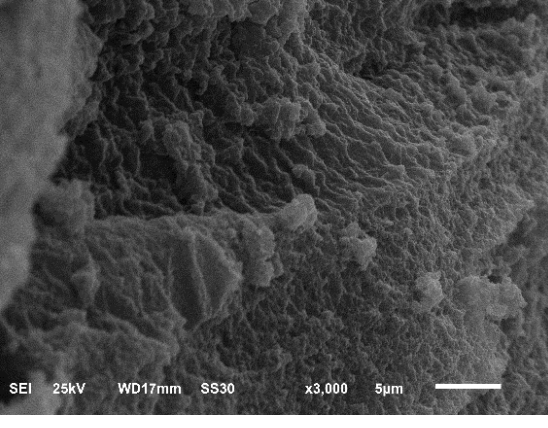
Grupos experimentais	Aumento 1.000X	Aumento 3.000X
1) Alginato/gelatina		
2) Alginato/gelatina/PRP		

Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura. 1) Alginato/gelatina; 2) Alginato/gelatina/PRP.

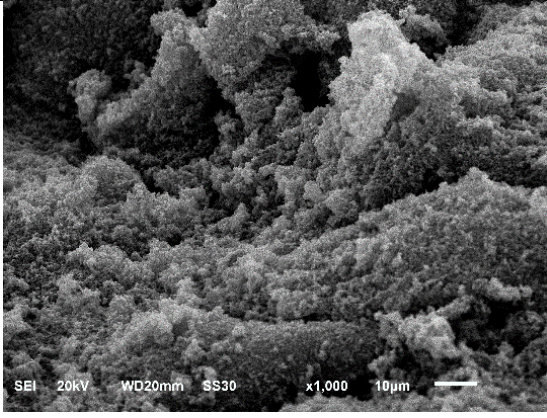
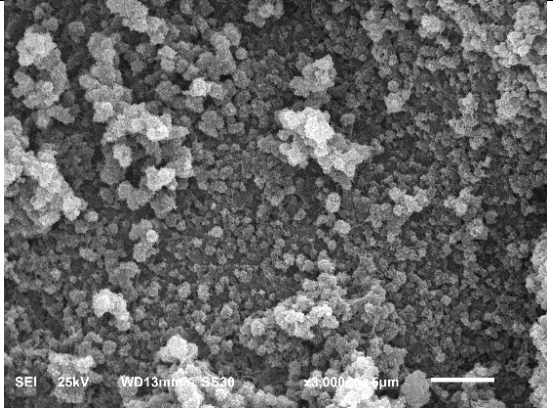
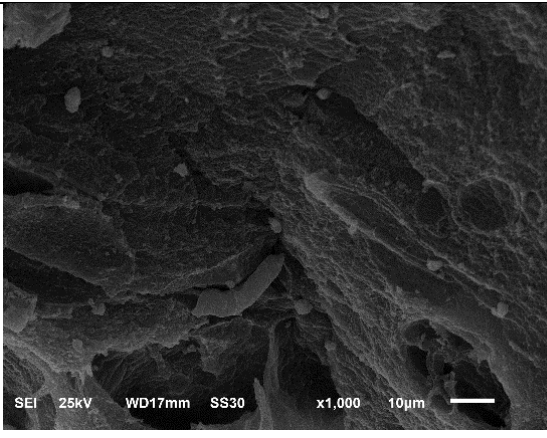
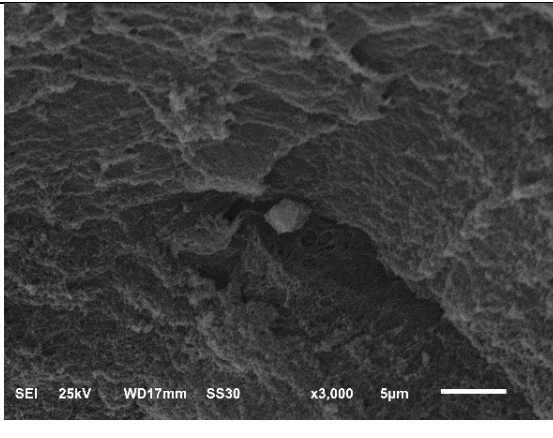
Grupos experimentais	Aumento 1.000X	Aumento 3.000X
1) Alginato/gelatina/prata		
2) Alginato/gelatina/PRP/prata		

Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura. 1) Alginato/gelatina/prata; 2) Alginato/gelatina/PRP/prata.

5. DISCUSSÃO

A incidência de feridas crônicas representa ônus econômico significativo a sociedade bem como crescente morbidade em pacientes portadores de doenças sistêmicas e/ou circulatórias. Os curativos desempenham um papel muito importante ao conferir proteção temporária ao tecido danificado, evitando ou controlando infecções à medida em que propicia um ambiente adequado ao processo regenerativo (CHEN AT AL., 2020).

A busca por biocurativos eficientes tem norteado a produção de *scaffolds* bioativos em TERM. Além de mimetizar as propriedades da matriz extracelular e conferir suporte físico à medida em que proporciona um microambiente adequado para vascularização, migração, proliferação e diferenciação celular, é interessante que os *scaffold* carregue agentes imunomoduladores a fim de superar o desafio de curar feridas de difícil cicatrização.

Considerando que o caráter crônico da ferida pode ser em razão da colonização microbiana e que número de bactérias multirresistentes as classes conhecidas de antibióticos naturais e sintéticos está aumentando a uma taxa alarmante é necessário, ainda que os *scaffolds*, especialmente empregados como biocurativos, possuam propriedades antimicrobianas (AMBROGI *et al.*, 2020). Neste contexto, a associação do hidrogel polimérico ao PRP e nanopartículas de prata, tende a estimular a regeneração de feridas crônicas.

O racional para o emprego do PRP decorre da liberação massiva dos fatores de crescimento plaquetários que são particularmente importantes ao potencializar o processo natural de cura de feridas crônicas, sistematicamente caracterizadas por inflamação e déficit de fatores de crescimento, especialmente durante a fase proliferativa, bem como está associada ao recrutamento de células mesenquimais e síntese de matriz extracelular (TAMBELLA *et al.*, 2018). No entanto, considerando que as concentrações finais de células e fatores de crescimento de dado PRP em particular

dependem de fatores intrínsecos (espécie, sexo, raça, idade, situação de saúde, uso de medicamentos) e fatores extrínsecos (centrífuga empregada, anticoagulante selecionado) capazes de influenciar nas características celulares e proteicas, diferentes trabalhos, empregando modelos animais e aplicações em seres humanos, têm apresentado resultados divergentes na literatura (CARMONA *et al.*, 2011; GIRALDO *et al.*, 2013). Além disso, a descrição pouco detalhada da metodologia adotada, bem como das concentrações plaquetárias obtidas acarretam resultados conflitantes e de difícil reprodutibilidade em virtude da falta de padronização metodológica (MARQUES *et al.*, 2014). Deste modo, este estudo teve como um dos objetivos a padronização de um protocolo de PRP humano reprodutível, eficiente e de baixo custo que possa ser associado a *scaffolds*.

Quanto à obtenção do PRP, o primeiro aspecto a ser considerado corresponde a escolha da centrífuga. Os diferentes tipos de vibrações inerentes de cada equipamento, bem como os protocolos de centrifugação exercem impactos significativos sobre as células, fatores de crescimento e arquitetura da fibrina. Desse modo, os materiais e métodos devem ser criteriosamente registrados a fim de se evitar dados discrepantes na literatura (EHRENFEST *et al.*, 2017). Outro aspecto metodológico importante refere-se ao tipo de anticoagulante empregado. Dentre os anticoagulantes citados na literatura, para o preparo do PRP, há trabalhos citando o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), citrato de sódio (CS) e o ácido cítrico solução dextrose A(ACD-A).

O uso do anticoagulante EDTA não é recomendável para o preparo do PRP porque promove a fragmentação das plaquetas (SANCHES *et al.*, 2003; LANDERBERG *et al.*, 2000; MERLINI *et al.*, 2014). Em um trabalho comparativo entre CS e ACD-A Carmona e colaboradores verificaram que não houve diferenças significativas quanto à concentração plaquetária e nem quanto a ativação das plaquetas no uso de ambos os anticoagulantes, apontando ainda a obtenção de plaquetas homogêneas e estáveis, especialmente após o uso do CS (CARMONA *et al.*, 2011). Com base nesses dados, e, considerando que os autores da maioria dos trabalhos reportados na literatura fazem uso do CS este trabalho optou por utilizar este

anticoagulante.

O PRP, tradicionalmente descrito como um volume de plasma com contagem plaquetária acima dos níveis basais, segundo MARX *et al.* (2004), deve conter a concentração plaquetária quatro a cinco vezes superior ao sangue periférico, ou, uma a concentração mínima de 5.000.000 a 1.000.000 plaquetas/ μ L (MARX, 2001). Contudo, ANITUA *et al.* (2016), consideram o valor superior a 300.000 plaquetas/ μ L suficiente para a obtenção do PRP, ao passo que alguns autores sugerem concentrações variando entre 2 a 6 vezes (VANAT *et al.*, 2012). Outros, defendem concentrações plaquetárias duas a oito vezes superior à concentração basal (FORTIER, 2011; MCILWRAIT, 2011). Tais variações frequentemente discrepantes relatadas na literatura podem ser atribuídas ao equipamento empregado, ao tamanho da amostra, bem como pela manipulação do material.

Dentre os protocolos comparados, o proposto por FRANCO *et al.* (2012) foi adotado neste estudo por apresentar diferença estatisticamente significativa quando comparado aos demais grupos experimentais, fornecendo a concentração de 2.4 vezes superior aos níveis basais (Tabela 3). Este resultado vai ao encontro da definição de MARX (2001), uma vez que a média de plaquetas obtidas foi de 5.290.000 plaquetas/ μ L de plasma. Contudo, esse valor foi bastante discrepante do obtido por FRANCO *et al.* (2012) visto que o autor alcançou a concentração de 8.5 vezes. Quanto aos demais protocolos analisados, o proposto por ANITUA *et al.* (2016) mostrou-se menos eficiente fornecendo concentrações plaquetárias variando entre valores inferiores a valores superiores aos níveis basais, de modo a não ser apropriado as condições laboratoriais. Os protocolos de AMABLE e Marques apresentaram resultados similares (1.8 e 1.9 vezes, respectivamente), contrariando os resultados obtidos por AMABLE que obteve concentrações variando de 5.4 a 7.3.

A proposição do quarto protocolo (Marques) partiu do princípio de que a primeira centrifugação, também chamada de leve, pode ser realizada com uma força g reduzida por um curto período de tempo com o simples objetivo de separar o plasma das hemácias. Após a obtenção do plasma, este deve então centrifugado a maiores forças g por um período maior de tempo para

que ocorra maior concentração de plaquetas no terço inferior do tubo (FRANCO *et al.*, 2012). Embora essa suposição tenha sido sustentada pelos resultados obtidos, a segunda centrifugação realizada por um tempo superior a dez minutos mostrou-se menos eficiente, de modo que, o protocolo proposto por FRANCO *et al.* (2012), além da maior concentração plaquetária apresenta como vantagem adicional de assegurar rapidez no preparo do material. Outro fator importante que pode ter contribuído para a obtenção de concentrações plaquetárias inferiores às obtidas por AMABLE pode ser atribuída ao emprego decentrífuga sem refrigeração, uma vez que a autora apontou esta variante como um fator importante para a adoção de tal protocolo.

Não há consenso em relação aos efeitos da presença de leucócitos no PRP (VENDRUSCO *et al.*, 2014). A concentração leucocitária no PRP depende do método obtenção empregado e de características próprias do doador tais como o estado de hidratação, inflamação, lipemia ou ritmo circadiano (BOSWELL *et al.*, 2012; VENDRUSCO *et al.*, 2014). Sabe-se, contudo, que os neutrófilos podem intensificar os danos iniciais pela liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-1, TNF- α , IL-6, MMP-8, MMP-9 e espécies reativas de oxigênio (ANITUA *et al.*, 2004; ZANDIM *et al.*, 2012). Quanto a liberação de fatores de crescimento pelos leucócitos os dados são conflitantes, uma vez que alguns autores corroboram esse efeito (ZIMMERMANN *et al.*, 2008) e outros apontam a inclusão de leucócitos aumentando a concentração de citocinas pró inflamatórias e interleucina 1 β e 16, sem a aumento da liberação de PDGF, bem como redução da disponibilidade de VEGF (ANITUA *et al.*, 2015). Há ainda autores que sugerem que o PRP com leucócitos cause mais dor local que o PRP puro (ARNOCZKY; DELOS; RODEO, 2011).

Apesar do efeito antibiótico, de reconhecida importância (MOOJEN *et al.*, 2008; CIESLIK- BIELECKA *et al.*, 2009) para o controle de infecções no local da úlcera, este trabalho optou por empregar PRP puro uma vez que na ausência de leucócitos a ocorrência de cicatrizes são minimizadas (DELONG; RUSSEL; MAZZOCCA, 2012; STESSUK, 2016). Deste modo, após o segundo processo de centrifugação, 1 mL do terço inferior de plasma foi aspirado de modo a se evitar aspirar os leucócitos decantados.

A literatura salienta que o acondicionamento do PRP à temperatura de

4°C, durante uma semana, conserva todas as propriedades das plaquetas (ALIÓ *et al.*, 2012; PANDA *et al.*, 2012). No entanto, para aplicações clínicas é necessário que as plaquetas sejam ativadas para que haja liberação dos fatores de crescimento. Dentre os principais agentes ativadores comumente empregados destacam-se a trombina, colágeno tipo I, ADP, tromboplastina, cloreto de cálcio, gluconato de cálcio ou a combinação entre os mesmos (VENDRUSCO *et al.*, 2014). Após ativação, ocorre a liberação dos fatores de crescimento, principalmente na primeira hora, persistindo durante o período de vida da plaqueta estimado em sete dias (COLE *et al.*, 2010; MCCARREL; FORTIER, 2009).

Segundo Jo *et al.*, 2013, a obtenção do gel na ausência de trombina reduz a perda dos fatores de crescimento por prevenir a ativação plaquetária precoce, bem como previne o risco de coagulopatia ou reações imunes, quando de origem bovina. Outra vantagem apontada pelos autores, refere-se a economia de tempo e recursos para o isolamento do trombina autóloga. Apesar de estudos prévios descritos na literatura apontarem que, na ausência de trombina o gel tende demandar mais tempo para se formar JO e colaboradores (2013) obtiveram o biomaterial em trinta minutos, enquanto o protocolo proposto por este trabalho obteve a formação de um gel consiste em tempo médio de 10 minutos (JO *et al.*, 2013).

O emprego da prata, cujas propriedades antimicrobianas são exploradas desde a antiguidade, destaca-se pela atividade contra as cepas encontradas em feridas colonizadas, incluindo espécies resistentes a antibióticos (TRIAL *et al.*, 2010). Chen *et al.*, em 2020, observou a distribuição uniforme da prata sobre o gel de alginato, com manutenção da propriedade de absorção de exudato e manutenção da umidade no leito da ferida, configurando, segundo o autor em um curativo ideal (CHEN *et al.*, 2020).

O teste de esterilização dos *scaffolds* em luz UV, permitiu evidenciar a eficácia da prata na prevenção de contaminação, uma vez que, mesmo no tempo zero de exposição a luz não foram observados quaisquer microrganismos nos diferentes grupos experimentais. A exposição prolongada a luz também levou a redução drástica de contaminação, porém, os *scaffolds* tiveram suas

propriedades comprometidas quanto maior o tempo de exposição (GUPTA *et al.*, 2013; LORSON *et al.*, 2020).

O emprego de gel polimérico a base de alginato e gelatina foi verificado em estudos desenvolvidos por MONDAL *et al.* (2019). O parâmetros de printabilidade do hidrogel foi alterado conforme a variações na concentração de alginato gelatina a 4. Formulações contendo concentrações de alginato menores do que 4% apresentam viscosidades extremamente baixas, inviabilizando a definição tridimensional, enquanto que elevadas concentrações demandaram aumento da pressões durante o processo de de extrusão. Tal aumento da aplicação de força, esta fortemente associado á menor viabilidade celular e plaquetária em decorrência da alta taxa de cisalhamento (NAIR *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2015).

A associação da gelatina ao alginato, melhora a bioadesividade de adjuvantes associados a blenda polimérica, além de conferir mais elasticidade ao hidrogel (PAN *et al.*, 2016). Contudo, vale destacar que concentrações superiores a 10% acarreta a agregação de peptídeos, comprometendo a extrusão do gel polimérico (GIUSEPPE *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019).

6. CONCLUSÃO

Em suma, as propriedades gelificação, baixa toxicidade, alta disponibilidade e baixo custo, fazem do alginato e da gelatina matérias-primas amplamente disponíveis para obtenção de scaffolds poliméricos. As plaquetas, por sua vez, ao desempenhar papel chave no processo da resposta tecidual à injúria por meio da liberação coordenada de moléculas bioativas, em associação à prata, configura uma biotinta viável ao processo de manufatura aditiva possibilitando a obtenção de curativos bioativos de baixo custo efetivo e reprodutibilidade com potencial a ser futuramente empregado como prática terapêutica em hospitais privados e no sistema único de saúde (SUS).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADERIBIGBE, B.A.; BUYANA, B. Alginate in Wound Dressings. *Pharmaceutics*. 2018 Apr 2;10(2):42. doi: 10.3390/pharmaceutics10020042.

AMABLE, P. R., CARIAS, R. B., TEIXEIRA, M. V., DA CRUZ PACHECO, I., CORRÊA DO AMARAL, R. J., GRANJEIRO, J. M., BOROJEVIC, R. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther*. 2013 Jun 7;4(3):67. doi: 10.1186/scrt218.

AMBROGI, V., PIETRELLA, D., DONNADIO, A., *et al.* Biocompatible alginate silica supported silver nanoparticles composite films for wound dressing with antibiofilm activity. *Materials Science and Engineering*. v. 112, n. January, p. 110863, 2020. DOI: 10.1016/j.msec.2020.110863. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110863>.

ANITUA, E., ZALDUENDO, M., TROYA, M., PADILLA, S., ORIVE, G.. Leukocyte inclusion within a platelet rich plasma-derived fibrin *scaffold* stimulates a more pro-inflammatory environment and alters fibrin properties. *PLoS One*. 2015 Mar 30;10(3):e0121713. doi: 10.1371/journal.pone.0121713.

ARYA, A. K. Recent advances on the association of apoptosis in chronic non healing diabetic wound. *World Journal of Diabetes*, v. 5, n. 6, p. 756, 2014. DOI: 10.4239/wjd.v5.i6.756.

AUGUSTINE, R.; RAJARATHINAM, K. Synthesis and characterization of silver nanoparticles and its immobilization on alginate coated sutures for the prevention of surgical wound infections and the in vitro release studies. *International Journal of Nanodimensions*. 2. 205-212, 2012.

BASU, S., GOSWAMI, A. G., DAVID, L. E., *et al.* Psychological Stress on Wound Healing: A Silent Player in a Complex Background. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*. 2022. DOI: 10.1177/15347346221077571.

BELLINI, M. Z., DE OLIVA-NETO, P., MORAES, Â. M. Properties of films obtained from biopolymers of different origins for skin lesions therapy. *Brazilian*

Archives of Biology and Technology. v. 58, n. 2, p. 289–299, 2015. DOI: 10.1590/S1516-8913201500305.

CABRAL, J., RYAN, A. E., GRIFFIN, M. D., *et al.* Extracellular vesicles as modulators of wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*. [S.l: s.n.], 2018.

CHEN, K., WANG, F., LIU, S., *et al.* In situ reduction of silver nanoparticles by sodium alginate to obtain silver-loaded composite wound dressing with enhanced mechanical and antimicrobial property. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 148, p. 501–509, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.156. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.156>.

CLEMENTE, R. Silver. In: Alloway, B. J (editor). *Heavy metals in soil*. United Kingdom: Springer, 2010. p. 535-542.

DAUNTON, C.; KOTHARI, S.; SMITH, L.; STEELE, D. A history of materials and practices for wound management. *Wound Practice and Research*. 20. 174-186, 2012.

DEMARRÉ, L., VAN LANCKER, A., VAN HECKE, A., *et al.* The cost of prevention and treatment of pressure ulcers: A systematic review. *International Journal of Nursing Studies*. v. 52, n. 11, p. 1754–1774, 2015. DOI: 10.1016/j.ijnurstu.2015.06.006.

DHIVYA, S., PADMA, V. V., SANTHINI, E. Wound dressings - A review. *BioMedicine (Netherlands)*. v. 5, n. 4, p. 24–28, 2015. DOI: 10.7603/s40681-015-0022-9.

DI MARZIO, N., EGLIN, D., SERRA, T., *et al.* Bio-Fabrication: Convergence of 3D Bioprinting and Nano-Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. v. 8, n. April, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00326.

DIECKMANN, C., RENNER, R., MILKOVA, L., *et al.* Regenerative medicine in dermatology: Biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. *Experimental Dermatology*. v. 19, n. 8, p. 697–706, 2010. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2010.01087.x.

DIXON, A. The United Nations Decade of Healthy Ageing requires concerted global action. *Nature Aging*. v. 1, n. 1, p. 2–2, 2021. DOI: 10.1038/s43587-020-00011-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s43587-020-00011-5>.

DOCKING, R.; BOATENG, J.; CATANZANO, O.; SCHOFIELD, P. A Preliminary Study of Pain Relieving Dressings for Older Adults With Chronic Leg Ulcers From the Provider's Perspective: A Qualitative Study. *J Pain Palliat Care Pharmacother*. 2018 Jun-Sep;32(2-3):71-81. doi: 10.1080/15360288.2018.1527801

FORREST, R. D. Early history of wound treatment. *Journal of the Royal Society of Medicine*. v. 75, n. 3, p. 198–205, 1982.

FRANCO, D., FRANCO, T., ANGÉLICA MARIA SCHETTINO, *et al.* Protocol for obtaining platelet-rich plasma (PRP), platelet-poor plasma (PPP), and thrombin for autologous use. *Aesthetic Plastic Surgery*. 2012. DOI: 10.1007/s00266-012-9957-3.

GAMBA, M.A.; PETRI, V.; COSTA, M.T.F. *Feridas: prevenção, causas e tratamento*. 1ª edição. Rio de Janeiro: Santos, 2016.

GEOVANI, T. *Tratado de feridas e curativos: enfoque multiprofissional*. 1ª edição. São Paulo: Rideel, 2014.

GIUSEPPE, M. D., LAW, N., WEBB, B. A., MACRAE, R., LIEW, L. J., SERCOMBE, T. B., DILLEY, R. J., DOYLE, B. J. Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018 Mar;79:150-157. doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.12.018.

GU, Z.; FU, J.; LIN, H.; HE, Y. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. *Asian J Pharm Sci*. 2020 Sep;15(5):529-557. doi: 10.1016/j.ajps.2019.11.003

GUPTA, A., AVCI, P., DAI, T., HUANG, Y. Y., HAMBLIN, M. R. Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013 Oct;2(8):422-437. doi: 10.1089/wound.2012.0366.

HERMETO, L. C., ROSSI, R. de, PÁDUA, S. B. de, *et al.* Comparative study between fibrin glue and platelet rich plasma in dogs skin grafts. *Acta Cirurgica*

Brasileira. v. 27, n. 11, p. 789–794, 2012. DOI: 10.1590/S0102-86502012001100008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502012001100008&lng=en&tlng=en.

HERNANDEZ, E. D. D., REYES-ROMERO, J. R. Materials for Biomedical Engineering Thermoset and Thermoplastic Polymer, Chapter 14: Characteristics of polymeric materials used in medicine. [S.l.], Elsevier Inc., 2019. v. 1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816874-5.00014-1>.

HERNANDEZ-CARMONA, G.; FREILE, P.; YOLANDA; GARIBAY, E. (2013). Conventional and alternative technologies for the extraction of algal polysaccharides. Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals. 475-516, 2013. doi: 10.1533/9780857098689.3.475.

HINDERER, S., LAYLAND, S. L., SCHENKE-LAYLAND, K. ECM and ECM-like materials - Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy. Advanced Drug Delivery Reviews. [S.l.: s.n.], 2016.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Governo do Brasil, 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/pt/inicio.html>

IQBAL, N., KHAN, A. S., ASIF, A., *et al.* Recent concepts in biodegradable polymers for tissue engineering paradigms: a critical review. International Materials Reviews. v. 64, n. 2, p. 91–126, 2019. DOI: 10.1080/09506608.2018.1460943. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09506608.2018.1460943>.

JIANG, D., RINKEVICH, Y. Furnishing wound repair by the subcutaneous fascia. International Journal of Molecular Sciences. v. 22, n. 16, p. 1–14, 2021. DOI: 10.3390/ijms22169006.

JINTAKOSOL, T.; NITAYAPHAT, W. Adsorption of silver (I) from aqueous solution using chitosan/montmorillonite composite beads. Materials Research. v. 19, n. 5, p. 1114-1121, 2016.

JOHANSON, T. The significance of believing in healing on the therapeutic value of spoken words in ancient Egyptian medical papyri. Tese (Doutorado) - Uppsala University, Disciplinary Domain of Humanities and Social Sciences, Faculty of

Arts, Department of Archaeology and Ancient History, 2019. Disponível em: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn%3Anbn%3Ase%3Auu%3Adiva-387626>

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 12^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAKARLA, A. B.; KONG, I.; TUREK, I.; KONG, C.; IRVING, H. Printable gelatin, alginate and boron nitride nanotubes hydrogel-based ink for 3D bioprinting and tissue engineering applications. *Materials & Design*, Volume 213, 2022. doi.org/10.1016/j.matdes.2021.110362.

KATARI, R., PELOSO, A., ORLANDO, G. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Semantic Considerations for an Evolving Paradigm. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. v. 2, n. January, p. 1–6, 2015. DOI: 10.3389/fbioe.2014.00057.

KOEHLER, J., BRANDL, F. P., GOEPFERICH, A. M. Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds. *European Polymer Journal*. v. 100, p. 1–11, 2018. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2017.12.046. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.12.046>.

KOHLHAUSER, M., LUZE, H., NISCHWITZ, S. P., *et al.* Historical evolution of skin grafting—a journey through time. *Medicina (Lithuania)*. v. 57, n. 4, p. 1–14, 2021. DOI: 10.3390/medicina57040348.

LARSEN, L., TCHANQUE-FOSSUO, C. N., GOROUHI, F., *et al.* Combination therapy of autologous adipose mesenchymal stem cell-enriched, high-density lipoaspirate and topical timolol for healing chronic wounds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. v. 12, n. 1, p. 186–190, 2018. DOI: 10.1002/term.2390.

LIN, K., ZHANG, D., MACEDO, M. H., *et al.* Advanced Collagen-Based Biomaterials for Regenerative Biomedicine. *Advanced Functional Materials* v. 29, n. 3, 2019. DOI: 10.1002/adfm.201804943.

LIU, J., LU, F., CHEN, H., *et al.* Healing of skin wounds using a new cocoon scaffold loaded with platelet-rich or platelet-poor plasma. *RSC Advances*. v. 7, n. 11, p. 6474–6485, 2017. DOI: 10.1039/c6ra27021b.

LORSON, T., RUOPP, M., NADERNEZHAD, A., EIBER, J., VOGEL, U., JUNGST, T., LÜHMANN, T. Sterilization Methods and Their Influence on Physicochemical Properties and Bioprinting of Alginate as a Bioink Component. *ACS Omega*. 2020 Mar 17;5(12):6481-6486. doi: 10.1021/acsomega.9b04096.

LOU, P., LIU, S., XU, X., *et al.* Extracellular vesicle-based therapeutics for the regeneration of chronic wounds: current knowledge and future perspectives. *Acta Biomaterialia*. v. 119, n. 1, p. 42–56, 2021. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.11.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.11.001>.

MALAGUTTI, W. Feridas: conceitos e atualidades. 1ª edição. São Paulo:Martinari, 2015.

MALAGUTTI, W.; KAKIHARA, C.T. Curativos, estomia e dermatologia: uma abordagem multiprofissional. 2ª edição. São Paulo:Martinari, 2011.

MARQUES, L. F., STESSUK, T., CAMARGO, I. C. C., *et al.* Platelet-rich plasma (PRP): Methodological aspects and clinical applications. *Platelets*. v. 7104, n. FEBRUARY, p. 1–13, 2014. DOI: 10.3109/09537104.2014.881991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24512369>.

MARX, R. E. Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? *Implant Dentistry*. 2001. DOI: 10.1097/00008505-200110000-00002.

MASSEE, M., CHINN, K., LIM, J. J., *et al.* Type I and II Diabetic Adipose-Derived Stem Cells Respond In Vitro to Dehydrated Human Amnion/Chorion Membrane Allograft Treatment by Increasing Proliferation, Migration, and Altering Cytokine Secretion. *Advances in Wound Care*. 2016. DOI: 10.1089/wound.2015.0661.

MOBARAK, M.; GHAFARI, M.; YAZDANPANA, M.; LUO, Y.; MILLS, D. K. Bioinks and bioprinting: A focused review. *Bioprinting*. Volume 18, June 2020, e00080/. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00080>

MONDAL, A. *et al.* Investigation of Rheology and 3D Printability of PDMS Nanocomposites Ink. *Proceedings of the American Society for Composites—Thirty-fourth Technical Conference*. 2019.

MORIMOTO, N., KAKUDO, N., MATSUI, M., *et al.* Exploratory clinical trial of combination wound therapy with a gelatin sheet and platelet-rich plasma in

patients with chronic skin ulcers: study protocol. *BMJ Open*. v. 5, n. 5, p. e007733–e007733, 2015. DOI: 10.1136/bmjopen-2015-007733. Disponível em: <http://bmjopen.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmjopen-2015-007733>.

MUZZIO, N., MOYA, S., ROMERO, G. Multifunctional *scaffolds* and synergistic strategies in tissue engineering and regenerative medicine. *Pharmaceutics*. v. 13, n. 6, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13060792.

NAIR, K., GANDHI, M., KHALIL, S., YAN, K. C., MARCOLONGO, M., BARBEE, K., SUN, W. Characterization of cell viability during bioprinting processes. *Biotechnol J*. 2009 Aug;4(8):1168-77. doi: 10.1002/biot.200900004.

NATIONAL INSTITUTE OF BIOMEDICAL IMAGING AND BIOENGINEERING (NIBIB). National Institutes of Health, 9000 Rockville Pike, Bethesda, MD 20892, 2017. Disponível em: <https://www.nibib.nih.gov/>.

NG, J. Y., OBUOBI, S., CHUA, M. L., *et al.* Biomimicry of microbial polysaccharide hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine – A review. *Carbohydrate Polymers*. v. 241, n. April, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116345.

NUSSBAUM, S. R., CARTER, M. J., FIFE, C. E., *et al.* An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds. *Value in Health*. v. 21, n. 1, p. 27–32, 2018. DOI: 10.1016/j.jval.2017.07.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jval.2017.07.007>.

PAN, T.; SONG, W.; CAO, X.; WANG, Y. 3D Bioplotting of Gelatin/Alginate Scaffolds for Tissue Engineering: Influence of Crosslinking Degree and Pore Architecture on Physicochemical Properties. *Journal of Materials Science & Technology*. 32, 2016. Doi:10.1016/j.jmst.2016.01.007.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. *Química Nova*, 2015.

RAGHAV, A., KHAN, Z. A., LABALA, R. K., *et al.* Financial burden of diabetic foot ulcers to world: a progressive topic to discuss always. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*. v. 9, n. 1, p. 29–31, 2018. DOI: 10.1177/2042018817744513.

REES, H. M.; ECKER, E. E. An improved method of counting blood platelets. J. Amer. Med. Ass., 80(9): 621-622, 1923.

ROCHE, F. C., HARRIS-TRYON, T. A. Illuminating the role of vitamin a in skin innate immunity and the skin microbiome: A narrative review. Nutrients. v. 13, n. 2, p. 1–9, 2021. DOI: 10.3390/nu13020302.

RODRIGUEZ J, PRATTA AS, ABBASSI N, FABRE H, RODRIGUEZ F, DEBARD C, ADOBATI J, BOUCHER F, MALLEIN-GERIN F, AUXENFANS C, DAMOUR O, MOJALLAL A. Evaluation of Three Devices for the Isolation of the Stromal Vascular Fraction from Adipose Tissue and for ASC Culture: A Comparative Study. Stem Cells Int. 2017;2017:9289213. doi: 10.1155/2017/9289213.

SALOMÉ, G. Processo de viver do portador com ferida crônica: atividades recreativas, sexuais, vida social e familiar. Saúde Coletiva; 07 (46) : 300 – 304, 2010.

SCAIN, S. F., FRANZEN, E., HIRAKATA, V. N. Riscos associados à mortalidade em pacientes atendidos em um programa de prevenção do pé diabético. Revista Gaúcha de Enfermagem. 2018. DOI: 10.1590/1983-1447.2018.20170230.

SEN, C. K. Human Wound and Its Burden: Updated 2020 Compendium of Estimates. Advances in Wound Care. v. 10, n. 5, p. 281–292, 2021. DOI: 10.1089/wound.2021.0026.

SHARMA, D., AGARWAL, P., JAIN, S., *et al.* Autologous platelet-rich plasma for treatment of ischemic ulcers in buerger's disease: A pilot study with short-term results. Indian Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 2018. DOI: 10.4103/ijves.ijves_47_17.

SORG, H., TILKORN, D. J., HAGER, S., *et al.* Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. European Surgical Research. v. 58, n. 1–2, p. 81–94, 2017. DOI: 10.1159/000454919.

SOUZA, N. R. de, FREIRE, D. de A., SOUZA, M. A. de O., *et al.* Fatores predisponentes para o desenvolvimento da lesão por pressão em pacientes idosos: uma revisão integrativa. Revista Estima. 2017. DOI: 10.5327/Z1806-3144201700040007.

STESSUK, T., PUZZI, M. B., CHAIM, E. A., *et al.* Platelet-rich plasma (PRP) and adipose-derived mesenchymal stem cells: stimulatory effects on proliferation and migration of fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Archives of Dermatological Research*. v. 308, n. 7, p. 511–520, 2016. DOI: 10.1007/s00403-016-1676-1.

TALUKDAR, D., DUTTA, K. Impact of wars on the evolution of civilizations. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*. v. 539, p. 122881, 2020. DOI: 10.1016/j.physa.2019.122881. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physa.2019.122881>.

TRIAL, C.; DARBAS, H.; LAVIGNE, J. P.; SOTTO, A.; SIMONEAU, G.; TILLET, Y.; TÉOT, L. Assessment of the antimicrobial effectiveness of a new silver alginate wound dressing: a RCT. *J Wound Care*. Jan;19(1):20-6, 2010. doi: 10.12968/jowc.2010.19.1.46095. Erratum in: *J Wound Care*. 2010 Mar;19(3):109. PMID: 20081570.

VENDRAMIN, F.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C.; PEREIRA, M.; FRANCO, T. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 33, 2006. DOI: 10.1590/S0100-69912006000100007.

VYAS, D; UDYAWAR, D. A review on current state of art of bioprinting. 3D printing and additive manufacturing technologies. Springer, Singapore, 2019. p. 195-201.

WANG, Q. Q., LIU, Y., ZHANG, C. J., ZHANG, C., ZHU, P. Alginate/gelatin blended hydrogel fibers cross-linked by Ca²⁺ and oxidized starch: Preparation and properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Jun;99:1469-1476. doi: 10.1016/j.msec.2019.02.091.

WESTPHALEN, N. Warfare, Ships and Medicine: Prehistoric Origins. April, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/342354971_Warfare_Ships_and_Medicine_Prehistoric_Origins.

WOO, S. H., JEONG, H. S., KIM, J. P., *et al.* Favorable vocal fold wound healing induced by platelet-rich plasma injection. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology*. v. 7, n. 1, p. 47–52, 2014. DOI: 10.3342/ceo.2014.7.1.47.

YAMADA, S., BEHFAR, A., TERZIC, A. Regenerative medicine clinical readiness. *Regenerative Medicine*. v. 16, n. 3, p. 309–322, 2021. DOI: 10.2217/rme-2020-0178.

YILMAZ, B., AL RASHID, A., MOU, Y. A., *et al.* Bioprinting: A review of processes, materials and applications. *Bioprinting*. v. 23, n. April, p. e00148, 2021. DOI: 10.1016/j.bprint.2021.e00148. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2021.e00148>.

YU, R., ZHANG, H., GUO, B. *Conductive Biomaterials as Bioactive Wound Dressing for Wound Healing and Skin Tissue Engineering*. [S.I.], Springer Singapore, 2022. v. 14. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40820-021-00751-y>.

ZHAO, Y., LI, Y., MAO, S., SUN, W., YAO, R. The influence of printing parameters on cell survival rate and printability in microextrusion-based 3D cell printing technology. *Biofabrication*. 2015 Nov 2;7(4):045002. doi: 10.1088/1758-5090/7/4/045002.

8. ANEXO

Anexo A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) para coleta de sangue

(RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012)

O(a) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “Estabelecimento de um bioprocessos para produção e impressão 3D de um biogel resultante da associação de alginato, gelatina, PRP e prata”, sob a responsabilidade da Laís Fernanda Marques, RG nº 44.523.422-2.

Este termo deverá ser elaborado em duas vias. Depois de lido, rubricado e assinado, uma via ficará em poder do sujeito ou de seu representante legal e a outra via em poder do pesquisador responsável.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências e Letras – UNESP/Campus de Assis. Qualquer dúvida quanto aos aspectos éticos poderão ser esclarecidas no telefone (18) 3302-5607 ou pelo e-mail cep@assis.unesp.br, ou diretamente com o pesquisadora no telefone (18) 3302-5856 ou e-mail laismarques@usp.br.

A pesquisa será realizada com o sangue total oriundo de procedimento de coleta por venóclise, com uso de seringa. O material será utilizado em uma pequena quantidade, necessária para concentração de plaquetas.

O sangue coletado será levado para o nosso laboratório, que está qualificado para a separação e isolamento do Plasma Rico em Plaquetas (PRP). As plaquetas obtidas serão concentradas por método de centrifugação e depois serão incorporadas em um hidrogel suporte de alginato-gelatina, para verificação da adesão, compatibilidade e estabilidade em meio a estes componentes. Estas informações são importantes para que, a partir deste estudo, seja possível ou não utilizar estas plaquetas para formulação de um biocurativo que atuará no processo de regeneração de feridas cutâneas utilizando material proveniente do próprio paciente, minimizando assim, os riscos de rejeição imunológica.

O seu médico já esclareceu ao Senhor(a) os riscos e benefícios do procedimento de coleta do sangue. Nós não participaremos desta etapa, apenas utilizaremos o material coletado para estudo científico. Se o(a) Senhor(a) concordar em ceder uma amostra de sangue, não haverá risco nenhum para a sua saúde e integridade física, pois todo o estudo será feito em laboratório, de forma controlada e segura.

Sua identidade será mantida em sigilo pelos pesquisadores, sendo utilizados apenas os dados necessários para esta pesquisa, tais como, faixa etária, condições de saúde, alimentação e quantidade de elementos presentes no sangue (concentração de plaquetas e leucócitos). Informamos ainda que os resultados deste estudo serão publicados em uma revista científica, mas, repetindo, sua identidade será mantida em sigilo.

O(a) Senhor(a) pode a qualquer momento desistir da doação do material, mesmo depois de ter assinado este termo de consentimento.

O(a) Senhor(a) deve estar à vontade para fazer qualquer pergunta sobre este estudo, podendo entrar em contato, a qualquer momento, com o pesquisador responsável cujo nome, telefone e endereço está abaixo colocado:

Pesquisadora responsável: Laís Fernanda Marques

Fone (18) 99777-8907

Endereço: Chácara São José – Palmital/ SP, CEP: 19970-000.

CONSENTIMENTO

Eu, _____, RG: _____, abaixo assinado, concordo em participar, como sujeito, da pesquisa “Estabelecimento de um bioprocessamento para produção e impressão 3D de um biogel resultante da associação de alginato, gelatina, PRP e prata”. Fui devidamente informado(a) e esclarecido pelo pesquisador Dr. João Tadeu Ribeiro Paes sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido, ainda, que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Declaro, ainda, que () concordo / () não concordo com a publicação dos resultados desta pesquisa, ciente da garantia quanto ao sigilo das minhas informações pessoais e ao meu anonimato.

Local e data _____, ____ de _____ de _____.

Assinatura

Eu, Laís Fernanda Marques, pesquisadora responsável pelo estudo, obtive de forma voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do sujeito/representante legal para a participação na pesquisa.

Assinatura do Pesquisador