

Atendendo a solicitação do(a) autor(a),  
o texto completo desta tese/dissertação  
será disponibilizado somente a partir de  
03/08/2024.

At the author's request, the full text of  
this thesis/dissertation will not be  
available until Aug 03, 2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**ANA CAROLINA FERREIRA BONAFÉ**

**CONFECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO EFEITO DE  
MEMBRANAS À BASE DE FIBROÍNA DE SEDA CARREGADAS OU  
NÃO COM NEUROTENSINA EM FERIDAS ABERTAS EM PALATO:  
*estudo in vitro e clínico randomizado***

**ANA CAROLINA FERREIRA BONAFÉ**

**CONFECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO EFEITO DE  
MEMBRANAS À BASE DE FIBROÍNA DE SEDA CARREGADAS OU NÃO COM  
NEUROTENSINA EM FERIDAS ABERTAS EM PALATO: estudo clínico  
randomizado**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Periodontia. Linha de pesquisa: Estudos sobre microbiologia, imunologia e terapia em periodontia e implantodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Ingrid Fernandes Mathias Santamaria

Coorientador: Prof. Assoc. Mauro Pedrine Santamaria

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Bonafé, Ana Carolina Ferreira

Confecção, caracterização e avaliação do efeito de membranas à base de fibroína de seda carregadas ou não com neurotensina em feridas abertas em palato: estudo in vitro e clínico randomizado / Ana Carolina Ferreira Bonafé.  
- São José dos Campos : [s.n.], 2022.

104 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientadora: Ingrid Fernandes Mathias Santamaria

Coorientador: Mauro Pedrine Santamaria

1. Periodontia. 2. Cicatrização de feridas. 3. Fibroína. 4. Neurotensina.  
I. Santamaria, Ingrid Fernandes Mathias, orient. II. Santamaria, Mauro Pedrine, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Ingrid Fernandes Mathias Santamaria** (Orientadora)

University of Maryland

School of Dentistry

Campus de Baltimore, EUA

**Pesq. Assoc. Camila Nunes Lemos**

Universidade de São Paulo (USP)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Ribeirão Preto

**Prof. Assoc. Renato Corrêa Viana Casarin**

Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

Faculdade de Odontologia

Campus de Piracicaba

São José dos Campos, 03 de agosto de 2022.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Roseli Aparecida Ferreira Bonafé** e **José André Bonafé**, a minha irmã **Letícia Ferreira Bonafé** e aos meus padrinhos **Maria da Conceição Ferreira dos Santos (Dinda)** e **João Batista dos Santos (Dindo)**. Dedico essa dissertação de mestrado a vocês, isso só foi possível graças ao apoio e amor infindável que vocês proporcionaram nos momentos de minha ausência, dedicados ao mestrado. Obrigada por me fazerem entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente. Não há palavras suficientes para agradecer-lhes por tudo de bom que fizeram e ainda fazem por mim.

Aos meus tios: **Pedro, Lúcia, Fernando, Antônio, Paula** e primos: **Camila, Ana Luiza, Pedro Lucca, Paulo Antônio e Maria Paula**, pelo carinho e apoio incondicional, sem o qual não seria possível superar essa etapa. Em especial à tia **Ana Lúcia** que me cedeu sua casa e companhia durante esses anos.

Ao meu namorado, **Mateus Ferreira Moreira**, pelo carinho, cumplicidade, paciência e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”** - Unesp, na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Assoc. Rebeca Di Nicoló e do vice-diretor Prof. Assoc. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

Aos Programas de **Pós-graduação em Biopatologia Bucal** e Ciências Aplicadas à Saúde Bucal, na pessoa do coordenador Prof. Alexandre Luiz Souto Borges.

À minha Orientadora **Profa. Ingrid Fernandes Mathias-Santamaria** e ao meu Coorientador **Prof. Mauro Pedrine Santamaria**. Esse ano foi um período de mudanças e adaptações, no entanto vocês continuaram me proporcionando o conhecimento, não apenas racional, mas também de manifestação do caráter e da educação no meu processo de formação profissional, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender a ser uma pessoa melhor. Obrigada por me ensinarem que “os ventos mais fortes, açoitam os picos mais altos”.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, principalmente as professoras da disciplina de periodontia: **Prof. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardim** e **Prof. Dra. Andrea Carvalho de Marco**.

Às técnicas do departamento de Diagnóstico e Cirurgia **Márcia Garcia e Valéria Silva**, e a secretária **Jacqueline Gomes**, pelo companheirismo diário, cafés, bolos e disposição a ajudar em todos os momentos.

À **Profa. Renata Fonseca Vianna Lopez** e as Pós-Graduandas do Centro de Inovação em Sistemas Nanoestruturados e Administração Tópica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP): **Camila Lemos, Luciana Dalmolin e Janete Muñoz**. Obrigada pela ajuda e disposição incansáveis diante de todas as adversidades encontradas no caminho do desenvolvimento do

biomaterial. Agradeço por serem fonte inesgotável de apoio técnico durante todo o processo.

A todos os funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação, Seção Técnica de Triagem e Documentação e Seção Técnica de Serviços do ICT-UNESP.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)**, pela concessão da Bolsa de Mestrado no período de 01/02/2020 a 30/09/2020 (88887.475123/2020-00) e 01/10/2020 a 31/07/2022 (88887.529139/2020-00).

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** - Chamada Universal MCTIC/CNPq n.º 28/2018, pela concessão de financiamento dessa pesquisa.

Às amigas que a pós graduação me proporcionou: **Amanda Rossato, Beatriz Simões, Cássia Araújo, Manuela Miguel e Laís Ferraz**. Nada disso seria possível sem vocês, eu agradeço cada momento de alegria e aprendizados que tivemos juntas, obrigada por me acolherem nessa família e por todo o auxílio que me proporcionaram nesses anos. À todos os outros colegas que ingressaram comigo nessa jornada.

Às amigas que a graduação me conferiu e que seguem inabaláveis: **Brenda Soares, Isis Patrícia Dias e Pedro Caio Barros**. Obrigada por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem, mesmo que de longe.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

Leonardo da Vinci

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>12</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>20</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1 Confeção das membranas à base de fibroína de seda</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1.1 Preparo das membranas à base de fibroína de seda F e FN</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1.2 Esterilização das membranas à base de fibroína de seda</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2 Caracterização das membranas</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2.1 Espessura das membranas</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2.2 Permeabilidade ao vapor de água</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2.3 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2.4 Análise termogravimétrica (TGA)</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2.5 Avaliação das propriedades de tensão e deformação da membrana</b> .	<b>28</b>
<b>3.2.6 Ensaio de intumescimento (<i>swelling</i>)</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2.7 Ensaio de degradação enzimática</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b> .....	<b>32</b>
<b>3.3 Citotoxicidade e genotoxicidade <i>in vitro</i></b> .....	<b>32</b>
<b>3.3.1 Viabilidade celular</b> .....	<b>32</b>
<b>3.4 Estudo clínico randomizado</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4.1 População de estudo</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4.2 Tamanho da amostra</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4.3 Critérios de inclusão</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4.4 Critérios de não-inclusão</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4.5 Randomização, ocultamento da alocação e cegamento</b> .....	<b>36</b>
<b>3.4.6 Aspectos éticos da pesquisa</b> .....	<b>36</b>
<b>3.4.7 Tratamento inicial</b> .....	<b>37</b>

3.4.8 Tratamentos .....	37
3.4.9 Procedimento cirúrgico .....	37
3.5 Avaliações clínicas.....	42
3.5.1 Área remanescente da ferida (ARF).....	43
3.5.2 Epitelização da ferida (EF) .....	44
3.5.3 Espessura do tecido (ET).....	45
3.5.4 Índice de cicatrização precoce da ferida (ICPF) .....	46
3.5.5 Edema tecidual (ED).....	47
3.6 Medidas e parâmetros centrados no paciente.....	47
3.6.1 Qualidade de vida associada à saúde oral (OHIP).....	47
3.6.2 Intensidade da dor pós operatória (DPO).....	48
3.6.3 Número de analgésicos (NA).....	48
3.7 Análise Estatística .....	48
4 RESULTADO .....	49
4.1 Caracterização .....	49
4.1.1 Espessura das membranas .....	49
4.1.2 Permeabilidade ao vapor de água.....	50
4.1.3 Calorimetria diferencial exploratória (DSC) .....	50
4.1.4 Análise termogravimétrica (TGA).....	53
4.1.5 Avaliação das propriedades de tensão e deformação da membrana .	54
4.1.6 Ensaio de intumescimento (swelling).....	55
4.1.7 Ensaio de degradação enzimática .....	56
4.1.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	57
4.2 Citotoxicidade e genotoxicidade <i>in vitro</i> .....	58
4.3 Análise clínica.....	63
4.3.1 Área remanescente da ferida (ARF).....	64
4.3.2 Epitelização da ferida (EF) .....	65
4.3.3 Espessura do tecido (ET).....	65
4.3.4 Índice de cicatrização precoce da ferida (ICPF) .....	67
4.3.5 Edema tecidual (ED).....	68
4.4 Medidas e parâmetros centrados no paciente.....	69
4.4.1 Qualidade de vida associada à saúde oral (OHIP).....	69
4.4.2 Intensidade da dor pós operatória .....	72

<b>4.4.3 Número de analgésicos .....</b>	<b>74</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>90</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>102</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema resumido da produção da solução de SF.....	23
Figura 2 - Membrana à base de fibroína de seda finalizada.....	24
Figura 3 - Esquema dos pontos de análise da espessura das membranas e análise com micrômetro.....	26
Figura 4 - Montagem das células de difusão para o teste e posicionamento dentro do dessecador.....	27
Figura 5 – Calorímetro.....	27
Figura 6 - Equipamento responsável pela análise das propriedades de tensão e deformação das membranas.....	29
Figura 7 - Dispositivo cilíndrico responsável pela análise do intumescimento das membranas.....	30
Figura 8 - Esquema da execução do teste de degradação enzimática.....	31
Figura 9 - Sequência da viabilidade celular.....	33
Figura 10 - Preservação de rebordo com o uso de enxerto gengival livre.....	39
Figura 11 - Sequência cirúrgica para a remoção do EGL e uso da membrana F.....	40
Figura 12 - Sequência de redimensionamento das membranas.....	41
Figura 13 - Aplicação do biomaterial na ferida.....	41
Figura 14 - <i>Stent</i> em acrílico para padronização dos enxertos e avaliações.....	43
Figura 15 - Escala em posição para referência da área da ferida.....	44
Figura 16 - Representação de uma ferida corada.....	45
Figura 17 - Mensuração da ET pela tomografia.....	46
Figura 18 - Espessura das membranas.....	49
Figura 19 - Permeabilidade ao vapor de água.....	50
Figura 20 - Curva de DSC da membrana à base de fibroína de seda (F).....	51
Figura 21 - Curva de DSC da membrana à base de fibroína de seda carregada com neurotensina (FN).....	51
Figura 22 - Gráfico comparando os eventos térmicos e a entalpia de F e FN.....	52
Figura 23 - Gráficos TGA das membranas F e FN.....	53
Figura 24 - Propriedades mecânicas das membranas F e FN.....	54
Figura 25 - Gráfico representando a % de intumescimento do material.....	55
Figura 26 - Gráfico de degradação enzimática.....	57
Figura 27 - Imagens obtidas por MEV.....	58
Figura 28 - Gráficos da citotoxicidade em HaCat e HFF-1.....	59
Figura 29 - Gráficos da citotoxicidade em fibroblastos gengivais humanos provenientes de 5 pacientes (avaliação unificada).....	60
Figura 30 - Gráficos da citotoxicidade em fibroblastos gengivais humanos provenientes de 5 pacientes (avaliação individualizada).....	61
Figura 31 - Gráficos da genotoxicidade em HaCat.....	62
Figura 32 - Diagrama de fluxo do estudo.....	64

Figura 33 - Índice de Cicatrização Precoce da Ferida aos 7 e 14 dias pós-operatórios .....	67
Figura 34 - Edema tecidual aos 7 dias pós-operatórios .....	69
Figura 35 - Gráfico de linha referente à qualidade de vida associada a saúde oral (OHIP) .....	70
Figura 36 - Gráfico da Intensidade da dor pós operatória (DPO) .....	72
Figura 37 - Número de analgésicos utilizados em 14 dias .....	74
Figura 38 - Sequência de fotos do GC com acompanhamento de 90 dias .....	76
Figura 39 - Sequência de fotos do grupo F com acompanhamento de 90 dias .....	77
Figura 40 - Sequência de fotos do grupo FN com acompanhamento de 90 dias .....	78

Bonafé ACF. Confeção, caracterização e avaliação do efeito de membranas à base de fibroína carregadas ou não com neurotensina em feridas abertas em palato: estudo clínico randomizado [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

## RESUMO

A utilização de enxertos autógenos provenientes do palato para reconstrução de tecidos gengivais, apesar de serem considerados o padrão-ouro, causam grande morbidade e dor pós-operatória. Assim, com o intuito de reduzir essas complicações, alguns biomateriais podem ser explorados, acelerando a cicatrização e trazendo maior conforto ao paciente. Dessa forma, os objetivos do presente estudo foram: confeccionar e caracterizar membranas à base de fibroína de seda sem carregamento (F) ou carregadas com neurotensina (FN) e avaliar clinicamente seus efeitos no reparo de feridas abertas no palato. Para a primeira parte, as membranas foram confeccionadas e caracterizadas quanto à espessura, propriedades mecânicas, textura superficial, permeabilidade ao vapor de água, degradação enzimática, citotoxicidade, genotoxicidade e intumescimento. Para a segunda parte, sessenta e um pacientes com necessidade de exodontia e preservação alveolar foram randomizados em três grupos: Controle: exodontia e selamento do alvéolo com EGL removido do palato; Grupo F: exodontia com EGL e inserção da membrana F na ferida palatina; Grupo FN: exodontia com EGL e membrana FN na ferida palatina. A reparação da área doadora palatina foi avaliada por parâmetros clínicos centrados nos pacientes. A partir dos resultados de caracterização, pode-se constatar a homogeneidade das membranas, alta resistência mecânica e maior intumescimento, permeabilidade e rugosidade superficial, características favoráveis para feridas intraorais. Em adição, não apresentaram citotoxicidade (HFF-1, HaCaT e fibroblastos gengivais humanos) e genotoxicidade (HaCaT) *in vitro*. Em relação aos resultados clínicos, em 14 dias FN mostrou maior diminuição de ARF ( $p < 0,001$ ) e melhor ET ( $p = 0,022$ ) do que F e GC; ao analisar-se o ICPF, ambos os biomateriais F e FN apresentaram melhores resultados em 14 dias comparados ao GC ( $p = 0,009$  e  $p = 0,001$  respectivamente); não houve diferença entre os grupos em relação ao ED ( $p = 0,312$ ) e ET ( $p = 0,120$ ). OHIP em F e FN se mostrou superior a GC a partir do 5º dia, NA e DPO mantiveram-se mais baixas em F e FN. Conclui-se que o uso de membranas à base de fibroína de seda carregadas ou não com NT apresenta benefícios clínicos no reparo de feridas e na qualidade de vida dos pacientes.

Palavras-chave: Periodontia. Cicatrização de feridas. Fibroína. Neurotensina.

Bonafé ACF. *Manufacturing, characterization, and evaluation of silk fibroin-based membranes with or without neurotensin on palatal wound healing: in vitro and randomized clinical trial [dissertation].* São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

## **ABSTRACT**

*The use of autogenous grafts from the palate for gingival tissue reconstruction, despite being considered the gold standard, causes great morbidity and postoperative pain. Thus, in order to reduce these complications, biomaterials can be explored, accelerating healing and bringing greater comfort to the patient. The objectives of the present study were: to manufacture and characterize unloaded (F) or neurotensin-loaded (FN) silk fibroin-based membranes and to clinically evaluate their effects on the repair of palatal open wounds. For the first part, the membranes were made and characterized in terms of thickness, mechanical properties, surface texture, water vapor permeability, enzymatic degradation, cytotoxicity, genotoxicity and swelling. For the second part, sixty-one patients in need of extraction and alveolar preservation were randomized into three groups: Control: extraction and alveolar socket sealing with FGG removed from the palate; Group F: extraction with FGG and F membrane incorporation in the palatal wound; Group FN: extraction with EGL and FN membrane in the palatal wound. Palatal donor site repair was assessed by patient-centered and clinical parameters. From the characterization results, membranes' high homogeneity, mechanical resistance, swelling, permeability and surface roughness, can be verified, being favorable characteristics for intraoral wounds. In addition, they showed no cytotoxicity (HFF-1, HaCaT and human gingival fibroblasts) and genotoxicity (HaCaT) in vitro. Regarding the clinical results, at 14 days FN showed a greater decrease in ARF ( $p < 0.001$ ) and better ET ( $p = 0.022$ ) than F and GC; when analyzing the ICPF, both biomaterials F and FN showed better results at 14 days compared to GC ( $p = 0.009$  and  $p = 0.001$  respectively); there was no difference between the groups regarding ED ( $p = 0.312$ ) and ET ( $p = 0.120$ ). OHIP in F and FN was superior to GC from the 5th day, NA and DPO remained lower in F and FN. It is concluded that the use of silk fibroin-based membranes loaded or not with NT has clinical benefits in wound repair and in the quality of life of patients.*

*Keywords: Periodontology. Wound healing. Silk fibroin. Randomized clinical trial.*

## 1 INTRODUÇÃO

Procedimentos cirúrgicos para a reconstrução dos tecidos gengival e peri-implantar com o objetivo de restabelecer a função e estética são uma rotina na clínica odontológica (Zucchelli et al., 2018). Diversos defeitos em tecido gengival e peri-implantar requerem tratamento, sendo a recessão gengival o mais comum entre eles. Recessão gengival é caracterizada pela exposição da superfície radicular ao meio oral (The American Academy of Periodontology, 2001). Além da sua alta prevalência, podendo atingir até 100% da população (Susin et al., 2004), as recessões gengivais podem trazer consequências como hipersensibilidade, desarmonia estética, maior susceptibilidade a formação de cárie radicular e lesões cervicais não cariosas (Toffenetti et al., 1998). Como os defeitos de recessão gengival são um problema bastante comum, diversas técnicas de reconstrução tecidual estão disponíveis para o seu tratamento (Chambrone, Tatakis, 2015). Tão importante quanto os defeitos periodontais em dentes, são os defeitos em peri-implantes. Com a expansão da utilização dos implantes osseointegrados para a reabilitação de perdas de elementos dentais, a saúde dos tecidos peri-implantares é necessária para que os implantes apresentem função e estética adequadas. A importância de uma adequada mucosa peri-implantar está relacionada com a estabilidade do tecido ósseo peri-implantar. Em estudos recentes, foi observado maior reabsorção óssea quando implantes foram instalados onde a mucosa apresentava espessura inferior à 2 mm (Linkevicius et al., 2009; van Eekeren et al., 2017). Ademais, os autores sugerem reconstrução tecidual durante a colocação de implantes osseointegrados para que os resultados sejam mais previsíveis.

Para se realizar a reconstrução desses tecidos moles, os procedimentos mais comumente utilizados são as técnicas cirúrgicas com a utilização de enxertos de tecidos autógenos, enxerto de tecido conjuntivo ou o de enxerto gengival livre (EGL). Essas técnicas são consideradas padrão ouro para o tratamento de recessões gengivais (Chambrone, Tatakis, 2015), assim como para aumento de tecido mole peri-implantar (Thoma et al., 2018). Além dessas, outras condições requerem a utilização de enxertos autógenos, como preservação de rebordo após exodontia (Wang, Lang, 2012) e correção de defeitos de rebordo (Stimmelmayer et al., 2011). Para tal, uma

porção de tecido conjuntivo (com ou sem a presença do epitélio de revestimento, dependendo da técnica e do defeito a ser tratado) é removido da mucosa palatina e enxertado no leito receptor.

Entretanto, essa técnica pode causar alto grau desconforto e morbidade nos pacientes (Wesel, Tatakis, 2008) pois dois sítios cirúrgicos são criados. Dessa forma, esse tipo de procedimento muitas vezes é rejeitado pelos pacientes com experiência prévia e assim obrigam os clínicos a buscarem biomateriais a fim de substituir a utilização do EGL. No entanto, os diversos biomateriais disponíveis podem aumentar os custos dos procedimentos e nem sempre geram os mesmos benefícios e resultados clínicos do tecido autógeno (Tonetti et al., 2018).

Para tentar contornar esse problema, novos materiais, drogas e dispositivos têm sido utilizados para melhorar os resultados das técnicas reconstrutivas e minimizar o desconforto gerado pela remoção de tecido autógeno do palato (Dias et al., 2015; Thoma et al., 2010; Thoma et al., 2012). Recentemente, a fibroína de seda (SF) tem sido explorada como um modelo de *scaffold* para o crescimento celular e regeneração tecidual (Sawatjui et al., 2014). Estudos recentes demonstraram que a utilização de SF com ou sem o carregamento de drogas promoveu a melhora em diversos tipos de lesões por todo o corpo, como ocular (Cubayachi et al., 2019), feridas em uretra (Algarrahi et al., 2018) e em feridas de derme e epiderme (Lou et al., 2009).

O tratamento de feridas com membranas baseia-se no conceito de proporcionar um microambiente favorável ao reparo, idealmente mantendo a umidade, baixa carga microbiana e conferindo uma eficaz circulação de oxigênio, protegendo, assim, a ferida de perda de fluidos e proteínas essenciais ao reparo (Boateng et al., 2008). Uma membrana bem-sucedida deve exibir características físicas e mecânicas adequadas e fornecer características pertinentes para facilitar a fixação, proliferação e diferenciação celular (Zhong et al., 2010).

Em conformidade com o conceito curativo das membranas, a SF tem sido utilizada como sistema de liberação sustentada de drogas na atualidade. Essa macromolécula é produzida pelos bichos da seda, principalmente pela espécie *Bombyx mori*, sendo uma das proteínas que compõe a seda pura, juntamente com a sericina. Apesar de ser a principal responsável pela excelente resistência mecânica e tenacidade, a sericina é conhecida por desencadear reações inflamatórias tanto pelas

características físico-químicas inerentes à essa proteína, quanto pela quebra e adsorção das suas cadeias polipeptídicas (Santin et al., 1999). Por esse motivo, a sericina passou a ser removida dos materiais usados na área médica, como nos fios de sutura (Um et al., 2001). Não somente, pode ativar significativamente a via intrínseca da cascata de coagulação, promover a coagulação do sangue, diminuir a perda de sangue e o tempo de sangramento (Lei et al., 2016).

A presença de características de *scaffold* dependerá da proporção de  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  presentes na membrana (Servoli et al., 2005; Kundu et al., 2013). A cadeia leve de  $\alpha$ -hélices, está ligada à cadeia pesada de folhas- $\beta$  por uma única ponte dissulfeto, sua sequência de aminoácidos de composição é padrão e não repetitiva, desempenhando um papel irrelevante nas aplicações médicas da SF. A folha  $\beta$  é uma cadeia pesada rica em glicina e a maior parte de sua sequência é uma repetição dos dipeptídeos Gly-Ala/Ser (Zhou et al., 2001). Pesquisadores comprovaram que a capacidade de liberação de substâncias em membranas de SF é, em grande parte, em virtude dessa sua estrutura secundária, a folha  $\beta$ . Para maior predomínio dessa forma, pode-se alterar as condições da síntese, como temperatura, pH, concentrações, velocidade de secagem e usar diferentes solventes com variados teores de etanol (Zhou et al., 2014). Dessa forma, pode-se ser considerada como um *scaffold* já que há evidências de adesão e proliferação celular (Bandyopadhyay, Mandal, 2019; Melke et al., 2015; Minoura et al., 1995; Zhou et al., 2017), sendo um potente adjuvante para a regeneração tecidual, característica que pode ser amplificada com o acréscimo de fármacos complexos e outros componentes em sua confecção, devido à sua propriedade inata de estabilização dessas moléculas (Cubayachi et al., 2019). No entanto, uma membrana composta exclusivamente de SF não apresenta a aplicabilidade necessária para ser usado em meio bucal, portanto para adequar sua maleabilidade e outras propriedades, a quitosana e ácido hialurônico são adicionados na composição da membrana base.

A quitosana vem sendo utilizada juntamente com a SF para a cicatrização de feridas em derme, ocular (Hermans et al., 2014) e mucosa oral devido às suas muitas vantagens, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades antibacterianas, mucoadesividade, analgesia e atividade hemostática (Takeuchi et al., 2019; Zhong et al., 2010). São polissacarídeos caracterizados por monômeros de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina distribuídos aleatoriamente, com uma ampla

gama de pesos moleculares. Embora a fonte mais comum de quitosana seja o exoesqueleto de organismos marinhos (crustáceos e lulas) (Younes, Rinaudo, 2015), o mercado também disponibiliza quitosanas produzidas por fungos e insetos (Ghormade et al., 2017; Perinelli et al., 2018).

Até o momento, nenhum consenso na área foi alcançado considerando os mecanismos exatos das ações antimicrobianas da quitosana, apesar de já ser um tema pesquisado há décadas (Allan, Hadwiger, 1979). Acredita-se que são atribuídos à sua capacidade de desestabilizar a membrana externa de bactérias Gram-negativas e permear a membrana plasmática microbiana, presumindo-se que a interação entre moléculas carregadas positivamente e membranas celulares microbianas carregadas negativamente leve a uma ruptura da membrana microbiana, seguida por um vazamento de constituintes intracelulares (Jøraholmen et al., 2020; Qi et al., 2004). Uma outra vantagem da carga positiva intrínseca da quitosana para auxiliar no fechamento de feridas é a sua mucoadesividade, sendo a mucina - constantemente secretada pelas glândulas salivares - a principal proteína responsável por essa ligação. Além disso, a despolimerização gradual da quitosana em N-acetil-D-glucosamina promove a proliferação de fibroblastos, acelerando assim o fechamento da ferida (Perinelli et al., 2018).

Outro ponto essencial a ser destacado, é a propriedade hemostática da quitosana. Atualmente, agentes hemostáticos derivados de quitosana têm sido usados para controle de sangramento pós-extração em pacientes. Pesquisadores documentaram o efeito analgésico na dor inflamatória, a liberação de íons pela quitosana na presença de condições ácidas, reduzem o pH da área afetada e causam a influência analgésica efetiva (Bano et al., 2017).

O ácido hialurônico (HA) é um glicosaminoglicano aniônico amplamente encontrado no tecido conjuntivo sendo um dos principais elementos constituintes da matriz extracelular, contribuindo para a propagação e migração celular. Essa substância iniciou sua entrada na área médica na década de 1970, quando passou a ser comercializada para tratamento de feridas oculares, no entanto, a molécula naturalmente sintetizada pelo organismo humano possui curta meia vida e pouca estabilidade (Vasvani et al., 2020). Como possui alta variação no seu peso molecular, o HA apresenta características de alta maleabilidade, extremamente úteis na área médica. A matriz extracelular é vital para a transdução de comunicação celular com

moléculas e receptores específicos como CD44, receptor para motilidade mediada por hialuronato (RHAMM), LYVE-1 (receptor de hialuronano endotelial de vaso linfático-1) e TSG6 (gene 6 estimulado por fator de necrose tumoral). Apesar de apresentar diversas associações, a interação do HA com o CD44 é responsável pela sua influência na adesão celular, contribuindo para o crescimento celular, sendo uma característica extremamente interessante para feridas orais (Huang, Huang, 2018).

Durante a inflamação, o HA de alto peso molecular, sofre uma diminuição no comprimento de sua cadeia, devido à atividade da hialuronidase ou clivagem por espécies reativas de oxigênio (EROS), tornando-se um HA de baixo peso molecular. Há evidências na literatura que demonstram que o HA de alto e baixo peso molecular tem a capacidade de ligação com receptores do tipo Toll (TRL), em específico o TRL-4, levando à inibição ou ativação, respectivamente, da via NF- $\kappa$ B (Lee et al., 2021).

O potencial do sistema nervoso em mediar o processo de cicatrização de feridas já foi comprovado (Pradhan et al., 2009). Os responsáveis por essa mediação são os neuropeptídeos, exemplos já conhecidos são a substância P, os neuropeptídeos Y (NPY) e a neurotensina (NT), que são amplamente distribuídos pelo sistema nervoso periférico, no entanto, ao aplicar essas moléculas em áreas de ferida, elas mostraram possuir meia vida curta e rápida perda da sua bioatividade devido à grande quantidade de enzimas presentes na região. (Moura et al., 2013). Seguindo essa linha, a NT foi eleita como objeto de estudo, já que em estudo recente, Lemos e colaboradores avaliaram o carregamento de SF com a NT em um sistema de liberação de droga para reparação de feridas (Lemos et al., 2018). A NT é um neuropeptídeo bioativo que tem um papel importante no processo inflamatório, interagindo com células imunes, em especial os leucócitos, mastócitos, células dendríticas e macrófagos. Não obstante, a NT influencia a vascularização, promovendo maiores formações de angiogêneses no microambiente da ferida, aumenta a permeabilidade e o tônus vascular (Moura et al., 2014; Pereira da Silva et al., 2014), estimula o crescimento celular (Scarpa et al., 2005) e reepitelização de mucosas com feridas crônicas (Brun et al., 2005). A NT é capaz de inibir a cascata de sinalização da via NF- $\kappa$ B, envolvida em várias respostas imunológicas, reduzir a expressão de interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e aumentar a concentração do fator de crescimento epidérmico; estes mediadores

desempenham papéis importantes na regeneração e proliferação de células da pele (Barrientos et al., 2008).

Com isso, apesar de ser evidente o potencial da NT, sua incorporação em uma forma farmacêutica a fim de resistir ao ambiente intraoral e exercer seu efeito necessita ser realizada. Para tanto, a combinação da NT com a membranas à base de SF, que já apresenta características inatas de modulação do processo inflamatório, tem potencial de ser de grande valia para a reparação tecidual de feridas abertas intraorais.

## 6 CONCLUSÃO

A metodologia padronizada para obtenção de dispersão aquosa de SF a partir de casulos do bicho-da-seda permitiu a formação de membranas transparentes e homogêneas, com equilibrado conteúdo em folhas  $\beta$  e  $\alpha$ -hélices, hidratação moderada, permeabilidade ao vapor de água e propriedades mecânicas adequadas para administração tópica oral, além de possibilitar a incorporação de NT no interior da matriz encapsulante mantendo suas características.

Não obstante, o estudo *in vitro* de ambas as membranas demonstrou que foi cumprida sua função de *scaffold* para crescimento celular e não se mostraram citotóxicas ou genotóxicas para as células analisadas.

O estudo clínico randomizado de superioridade, paralelo e duplo-cego elaborado evidenciou que ambos os biomateriais apresentaram melhor desempenho em relação ao GC na variável principal (ARF) e nas variáveis ICPF, EF, OHIP. Em contraste, não demonstraram diferenças estatisticamente significantes em relação às variáveis NA, DPO, ED e ET.

Conclui-se que, dentro dos limites do presente estudo clínico, o uso de membranas à base de fibroína de seda carregadas ou não com NT, apresentou grande potencial para acelerar o reparo de feridas palatinas.

## REFERÊNCIAS\*

Abdel-Naby W, Cole B, Liu A, Liu J, Wan P, Guaiquil VH, et al. Silk-Derived protein enhances corneal epithelial migration, adhesion, and proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017 Mar 1;58(3):1425-33. doi: 10.1167/iovs.16-19957. PMID: 28257533; PMCID: PMC6022413

Al-Shibani N. Low-intensity laser for harvesting palatal graft for the treatment of gingival recession: A systematic review. *J Invest Clin Dent*. 2019;10:e12368. doi:10.1111/jicd.12368.

Allan CR, Hadwiger LA. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Exp Mycol*. 1979 Sep;3(3):285-7.

Algarrahi K, Affas S, Sack BS, Yang X, Costa K, Seager C, et al. Repair of injured urethras with silk fibroin scaffolds in a rabbit model of onlay urethroplasty. *J Surg Res*. 2018 Sep;229:192-199.

American Society for Testing and Materials - ASTM. ASTM D882-02: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting [Internet]. West Conshohocken (PA): ASTM; 2002.

Baad-Hansen L, Pigg M, Ivanovic SE, Faris H, List T, Drangsholt M, et al. Intraoral somatosensory abnormalities in patients with atypical odontalgia--a controlled multicenter quantitative sensory testing study. *Pain*. 2013 Aug;154(8):1287-94. doi: 10.1016/j.pain.2013.04.005. Epub 2013 Apr 6. PMID: 23725780; PMCID: PMC3700589.

Bandyopadhyay A, Mandal BB. A three-dimensional printed silk-based biomimetic tri-layered meniscus for potential patient-specific implantation. *Biofabrication*. 2019 Oct 21;12(1):015003. doi: 10.1088/1758-5090/ab40fa. PMID: 31480031.

Bano I, Arshad M, Yasin T, Ghauri MA, Younus M. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. *Int J Biol Macromol*. 2017 Sep;102:380-383. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.047. Epub 2017 Apr 13. PMID: 28412341.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):585-601. doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x.

Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci*. 2008 Aug;97(8):2892-923. doi: 10.1002/jps.21210. PMID: 17963217.

---

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Borra RC, Lotufo MA, Gagiotti SM, Barros Fde M, Andrade PM. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Braz Oral Res.* 2009 Jul-Sep;23(3):255-62. doi: 10.1590/s1806-83242009000300006. PMID: 19893959.

Brun P, Mastrotto C, Beggiao E, Stefani A, Barzon L, Sturniolo GC, et al. Neuropeptide neurotensin stimulates intestinal wound healing following chronic intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 Apr;288(4):G621-9. doi: 10.1152/ajpgi.00140.2004. PMID: 15764810.

Burkhardt R, Hammerle CHF, Lang NP, On behalf of the Research Group on Oral Soft Tissue Biology & Wound Healing. Self-reported pain perception of patients after mucosal graft harvesting in the palatal area. *J Clin Periodontol.* 2015;42:281–7. doi: 10.1111/jcpe.12357.

Carraway RE, Mitra SP, Feurle GE, Hacki WH. Presence of neurotensin and neuromedin-N within a common precursor from a human pancreatic neuroendocrine tumor. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988 Jun;66(6):1323-8. doi: 10.1210/jcem-66-6-1323. PMID: 3131383.

Chambrone L, Tatakis DN. Periodontal soft tissue root coverage procedures: a systematic review from the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol.* 2015;86(2 Suppl):S8-S51. doi:10.1902/jop.2015.130674 .

Chauncey HH, Lionetti F, Winer RA, Lisanti VF. Enzymes of human saliva. I. The determination, distribution, and origin of whole saliva enzymes. *J Dent Res.* 1954 Jun;33(3):321-34. doi: 10.1177/00220345540330030501. PMID: 13163272.

Couto RO, Cubayachi C, Lopez RF, de Gaitani CM, Pedrazzi V, de Freitas O. A simple and high-resolution HPLC-PDA method for simultaneous quantification of local anesthetics in in vitro buccal permeation enhancement studies. *Biomed Chromatogr.* 2016 Jun;30(6):857-66. doi: 10.1002/bmc.3619. Epub 2015 Nov 17. PMID: 26379211.

Cubayachi C, Lemos CN, Pereira F, Dias K, Herculano RD, de Freitas O, et al. Silk fibroin films stabilizes and releases bioactive insulin for the treatment of corneal wounds. *Eur Polymer J.* 2019; 118:502-13. doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.06.022.

da Silva Neves FL, Silveira CA, Dias SB, Santamaria Júnior M, de Marco AC, Kerbauy WD, et al. Comparison of two power densities on the healing of palatal wounds after connective tissue graft removal: randomized clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2016 Sep;31(7):1371-8. doi: 10.1007/s10103-016-1988-6. Epub 2016 Jun 25. PMID: 27344670.

De Moraes MA, Weska RF, Beppu MM. Effects of sterilization methods on the physical, chemical, and biological properties of silk fibroin membranes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014a May;102(4):869-76. doi: 10.1002/jbm.b.33069. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24259492.

De Moraes MA, Silva MF, Weska RF, Beppu MM. Silk fibroin and sodium alginate blend: miscibility and physical characteristics. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014b Jul 1;40:85-91. doi: 10.1016/j.msec.2014.03.047. Epub 2014 Mar 26. PMID: 24857469.

Dias SB, Fonseca MV, Dos Santos NC, Mathias IF, Martinho FC, Junior MS, et al. Effect of GaAIA's low-level laser therapy on the healing of human palate mucosa after connective tissue graft harvesting: randomized clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2015;30(6):1695-1702. doi:10.1007/s10103-014-1685-2.

Do Couto RO, Cubayachi C, Calefi PL, Lopez RFV, Pedrazzi V, De Gaitani CM, et al. Combining amino amide salts in mucoadhesive films enhances needle-free buccal anesthesia in adults. *J Control Release*. 2017;266:205-215. doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.039.

Doshi A, McAuley JW, Tatakis DN. Topical phenytoin effects on palatal wound healing. *J Periodontol*. 2021 Mar;92(3):409-418. doi: 10.1002/JPER.20-0340. Epub 2020 Aug 27. PMID: 32761909.

Elliott WH, Bonani W, Maniglio D, Motta A, Tan W, Migliaresi C. Silk hydrogels of tunable structure and viscoelastic properties using different chronological orders of genipin and physical cross-linking. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015 Jun 10;7(22):12099-108. doi: 10.1021/acsami.5b02308. Epub 2015 May 27. PMID: 25978549; PMCID: PMC4872633

Femminella B, Iaconi MC, Di Tullio M, Romano L, Sinjari B, D'Arcangelo C, et al. Clinical comparison of platelet-rich fibrin and a gelatin sponge in the management of palatal wounds after epithelialized free gingival graft harvest: a randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2016 Feb;87(2):103-13. doi: 10.1902/jop.2015.150198. Epub 2015 Aug 27. PMID: 26313017

Fickl S, Fischer KR, Jockel-Schneider Y, Stappert CF, Schlagenhauf U, et al. Early wound healing and patient morbidity after single-incision vs. trap-door graft harvesting from the palate--a clinical study. *Clin Oral Investig*. 2014;18(9):2213-2219. doi:10.1007/s00784-014-1204-7.

Ghormade V, Pathan EK, Deshpande MV. Can fungi compete with marine sources for chitosan production? *Int J Biol Macromol*. 2017 Nov;104(Pt B):1415-1421. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.112. Epub 2017 Jan 29. PMID: 28143744.

Guan Y, You H, Cai J, Zhang Q, Yan S, et al. Physically crosslinked silk fibroin/hyaluronic acid scaffolds. *Carbohydr Polym*. 2020 Jul 1;239:116232. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116232. Epub 2020 Apr 6. PMID: 32414432.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008 May 15;453(7193):314-21. doi: 10.1038/nature07039. PMID: 18480812.

Gusman DJ, Matheus HR, Alves BE, de Oliveira AM, Britto AS, Novaes VC, et al. Platelet-rich fibrin for wound healing of palatal donor sites of free gingival grafts: Systematic review and meta-analysis. *J Clin Exp Dent*. 2021 Feb 1;13(2):e190-e200. doi: 10.4317/jced.57451. PMID: 33575004; PMCID: PMC7864367.

Hazra S, Nandi S, Naskar D, Guha R, Chowdhury S, Pradhan N, et al. Non-mulberry Silk fibroin biomaterial for corneal regeneration. *Sci Rep*. 2016 Feb 24;6:21840. doi: 10.1038/srep21840. PMID: 26908015; PMCID: PMC4764817.

Hermans K, Van den Plas D, Kerimova S, Carleer R, Adriaenssens P, Weyenberg W, et al. Development and characterization of mucoadhesive chitosan films for ophthalmic delivery of cyclosporine A. *Int J Pharm*. 2014 Sep 10;472(1-2):10-9. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.06.017. Epub 2014 Jun 11. PMID: 24929014.

Huang G, Huang H. Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. *Drug Deliv*. 2018 Nov;25(1):766-772. doi: 10.1080/10717544.2018.1450910. PMID: 29536778; PMCID: PMC6058522.

Iglesias-Bartolome R, Uchiyama A, Molinolo AA, Abusleme L, Brooks SR, Callejas-Valera JL, et al. Transcriptional signature primes human oral mucosa for rapid wound healing. *Sci Transl Med*. 2018 Jul 25;10(451). pii: eaap8798. doi:10.1126/scitranslmed.aap8798.

Jøraholmen MW, Bhargava A, Julin K, Johannessen M, Škalko-Basnet N. The antimicrobial properties of chitosan can be tailored by formulation. *Mar Drugs*. 2020 Jan 31;18(2):96. doi: 10.3390/md18020096. PMID: 32023890; PMCID: PMC7074233.

Keskiner I, Aydogdu A, Balli U, Kaleli AE. Quantitative changes in palatal donor site thickness after free gingival graft harvesting: a pilot study. *J Clin Periodontol*. 2016;43:976–84. doi: 10.1111/jcpe.12592

Knösel M, Attin R, Jung K, Brunner E, Kubein-Meesenburg D, Attin T. Digital image color analysis compared to direct dental CIE colorimeter assessment under different ambient conditions. *Am J Dent*. 2009 Apr;22(2):67. PMID: 19626967.

Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013 Apr;65(4):457-70. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.043. Epub 2012 Nov 5. PMID: 23137786.

Lammel AS, Hu X, Park SH, Kaplan DL, Scheibel TR. Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials*. 2010 Jun;31(16):4583-91. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.02.024. Epub 2010 Mar 9. PMID: 20219241; PMCID: PMC2846964.

Lawrence BD, Marchant JK, Pindrus MA, Omenetto FG, Kaplan DL. Silk film biomaterials for cornea tissue engineering. *Biomaterials*. 2009 Mar;30(7):1299-308. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.11.018. Epub 2008 Dec 6. PMID: 19059642; PMCID: PMC2670567.

- Lee BM, Park SJ, Noh I, Kim CH. The effects of the molecular weights of hyaluronic acid on the immune responses. *Biomater Res*. 2021 Aug 30;25(1):27. doi: 10.1186/s40824-021-00228-4. PMID: 34462017; PMCID: PMC8404285.
- Lee MC, Kim DK, Lee OJ, Kim JH, Ju HW, Lee JM, et al. Fabrication of silk fibroin film using centrifugal casting technique for corneal tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016 Apr;104(3):508-14. doi: 10.1002/jbm.b.33402. Epub 2015 May 1. PMID: 25939800.
- Lei C, Zhu H, Li J, Feng X, Chen J. Preparation and hemostatic property of low molecular weight silk fibroin. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2016;27(5):403-18. doi: 10.1080/09205063.2015.1136918. Epub 2016 Feb 5. PMID: 26732018.
- Lemos CN, Cubayachi C, Dias K, Mendonça JN, Lopes NP, Furtado NAJC, et al. Iontophoresis-stimulated silk fibroin films as a peptide delivery system for wound healing. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018;128:147-155. doi:10.1016/j.ejpb.2018.04.019.
- Li AB, Kluge JA, Guziewicz NA, Omenetto FG, Kaplan DL. Silk-based stabilization of biomacromolecules. *J Control Release*. 2015;219:416-430. doi:10.1016/j.jconrel.2015.09.037
- Li M, Lu S, Wu Z, Tan K, Minoura N, Kuga S. Structure and properties of silk fibroin-poly(vinyl alcohol) gel. *Int J Biol Macromol*. 2002;30(2):89-94. doi:10.1016/s0141-8130(02)00007-7.
- Li TT, Sun L, Zhong Y, Peng HK, Ren HT, Zhang Y, et al. Silk fibroin/polycaprolactone-polyvinyl alcohol directional moisture transport composite film loaded with antibacterial drug-loading microspheres for wound dressing materials. *Int J Biol Macromol*. 2022 May 15;207:580-591. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.02.105. Epub 2022 Feb 24. PMID: 35218809.
- Li X, Liu Y, Zhang J, You R, Qu J, Li M. Functionalized silk fibroin dressing with topical bioactive insulin release for accelerated chronic wound healing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Mar 1;72:394-404. doi: 10.1016/j.msec.2016.11.085. Epub 2016 Nov 24. PMID: 28024602.
- Li X, Yan S, Qu J, Li M, Ye D, You R, et al. Soft freezing-induced self-assembly of silk fibroin for tunable gelation. *Int J Biol Macromol*. 2018 Oct 1;117:691-695. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.223. Epub 2018 May 31. PMID: 29859277.
- Liu J, Yan L, Yang W, Lan Y, Zhu Q, Xu H, et al. Controlled-release neurotensin-loaded silk fibroin dressings improve wound healing in diabetic rat model. *Bioact Mater*. 2019 Mar 28;4:151-9. doi: 10.1016/j.bioactmat.2019.03.001. PMID: 30989151; PMCID: PMC6447858
- Linkevicius T, Apse P, Grybauskas S, Puisys A. The influence of soft tissue thickness on crestal bone changes around implants: a 1-year prospective controlled clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24(4):712-719.

- Lou RB, Hickerson WL. The use of skin substitutes in hand burns. *Hand Clin.* 2009;25(4):497-509. doi:10.1016/j.hcl.2009.06.002.
- Lu S, Wang X, Lu Q, Zhang X, Kluge JA, Uppal N, et al. Insoluble and flexible silk films containing glycerol. *Biomacromolecules.* 2010 Jan 11;11(1):143-50. doi: 10.1021/bm900993n. PMID: 19919091.
- Luangbudnark W, Viyoch J, Laupattarakasem W, Surakunprapha P, Laupattarakasem P. Properties and biocompatibility of chitosan and silk fibroin blend films for application in skin tissue engineering. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:697201. doi: 10.1100/2012/697201. Epub 2012 May 22. PMID: 22701367; PMCID: PMC3366240.
- Maciel B, Moreira P, Carmo H, Gonçalo M, Lobo JMS, Almeida IF. Implementation of an in vitro methodology for phototoxicity evaluation in a human keratinocyte cell line. *Toxicol In Vitro.* 2019 Dec;61:104618. doi: 10.1016/j.tiv.2019.104618. Epub 2019 Aug 2. PMID: 31381965.
- Madi M, Kassem A. Topical simvastatin gel as a novel therapeutic modality for palatal donor site wound healing following free gingival graft procedure. *Acta Odontol Scand.* 2018 Apr;76(3):212-219. doi: 10.1080/00016357.2017.1403648. Epub 2017 Nov 16. PMID: 29145771.
- Magoshi J, Magoshi Y, Nakamura S, Kasai N, Kakudo M. Physical properties and structure of silk. V. Thermal behavior of silk fibroin in the random-coil conformation. *J Polym Sci Polym Phys Ed.* 1997 Sep;15(9):1675-83. <https://doi.org/10.1002/pol.1977.180150915>
- Melke J, Midha S, Ghosh S, Ito K, Hofmann S. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2016 Feb;31:1-16. doi: 10.1016/j.actbio.2015.09.005. Epub 2015 Sep 7. PMID: 26360593.
- Miguel MMV, Mathias-Santamaria IF, Rossato A, Ferraz LFF, Figueiredo-Neto AM, de Marco AC, et al. Microcurrent electrotherapy improves palatal wound healing: Randomized clinical trial. *J Periodontol.* 2021a Feb;92(2):244-253. doi: 10.1002/JPER.20-0122. Epub 2020 Aug 30. PMID: 32783220.
- Miguel MMV, Mathias-Santamaria IF, Rossato A, Ferraz LFF, Rangel TP, Casarin RCV, et al. Enamel matrix derivative effects on palatal mucosa wound healing: Randomized clinical trial. *J Periodontol Res.* 2021b Dec;56(6):1213-1222. doi: 10.1111/jre.12934. Epub 2021b Sep 19. PMID: 34541683.
- Moher D, Hopewell S, Schulz KF, Montori V, Gøtzsche PC, Devereaux PJ, et al. CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *Int J Surg.* 2012;10(1):28-55. doi:10.1016/j.ijsu.2011.10.001.

Morales JO, McConville JT. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;77(2):187-199. doi:10.1016/j.ejpb.2010.11.023.

Motta A, Barbato B, Foss C, Torricelli P, Migliaresi C. Stabilization of Bombyx mori silk fibroin/sericin films by crosslinking with PEG-DE 600 and genipin. *J Bioact Compat Polym.* 2011 March 25;26(2):130–43. <https://doi.org/10.1177/0883911511400251>

Moura LI, Dias AM, Suesca E, Casadiegos S, Leal EC, Fontanilla MR, et al. Neurotensin-loaded collagen dressings reduce inflammation and improve wound healing in diabetic mice. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jan;1842(1):32-43. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.10.009. Epub 2013 Oct 23. PMID: 24161538.

Minoura N, Aiba S, Higuchi M, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y. Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Mar 17;208(2):511-6. doi: 10.1006/bbrc.1995.1368. PMID: 7695601.

Negut I, Dorcioman G, Grumezescu V. Scaffolds for wound healing applications. *Polymers (Basel).* 2020 Sep 3;12(9):2010. doi: 10.3390/polym12092010. PMID: 32899245; PMCID: PMC7563417.

Nunes KM, Teixeira CC, Kaminski RC, Sarmento VH, Couto RO, Pulcinelli SH, et al. The monoglyceride content affects the self-assembly behavior, rheological properties, syringeability, and mucoadhesion of in situ-gelling liquid crystalline phase. *J Pharm Sci.* 2016 Aug;105(8):2355-64. doi: 10.1016/j.xphs.2016.05.005. Epub 2016 Jun 21. PMID: 27339408

O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol.* 1972;43(1):38. doi:10.1902/jop.1972.43.1.38.

Ozcelik O, Cenk Haytac M, Kunin A, Seydaoglu G. Improved wound healing by low-level laser irradiation after gingivectomy operations: a controlled clinical pilot study. *J Clin Periodontol.* 2008;35(3):250-254. doi:10.1111/j.1600-051X.2007.01194.x.

Pawar HV, Tetteh J, Boateng JS. Preparation, optimisation and characterisation of novel wound healing film dressings loaded with streptomycin and diclofenac. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;102:102-110. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.08.014.

Pereira da Silva L, Miguel Neves B, Moura L, Cruz MT, Carvalho E. Neurotensin decreases the proinflammatory status of human skin fibroblasts and increases epidermal growth factor expression. *Int J Inflamm.* 2014;2014:248240. doi:10.1155/2014/248240.

Perinelli DR, Fagioli L, Campana R, Lam JKW, Baffone W, Palmieri GF, et al. Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. *Eur J Pharm Sci.* 2018 May 30;117:8-20. doi: 10.1016/j.ejps.2018.01.046. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29408419.

Pradhan L, Nabzdyk C, Andersen ND, LoGerfo FW, Veves A. Inflammation and neuropeptides: the connection in diabetic wound healing. *Expert Rev Mol Med*. 2009 Jan 13;11:e2. doi: 10.1017/S1462399409000945. PMID: 19138453; PMCID: PMC3708299.

Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr Res*. 2004 Nov 15;339(16):2693-700. doi: 10.1016/j.carres.2004.09.007. PMID: 15519328.

Richard Bowen W, Doneva TA. Atomic Force microscopy studies of membranes: effect of surface roughness on double-layer interactions and particle adhesion. *J Colloid Interface Sci*. 2000 Sep 15;229(2):544-9. doi: 10.1006/jcis.2000.6997. PMID: 10985834.

Rossmann JA, Rees TD. A comparative evaluation of hemostatic agents in the management of soft tissue graft donor site bleeding. *J Periodontol*. 1999 Nov;70(11):1369-75. doi: 10.1902/jop.1999.70.11.1369. PMID: 10588501.

Santin M, Motta A, Freddi G, Cannas M. In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *J Biomed Mater Res*. 1999 Sep 5;46(3):382-9. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(19990905)46:3<382::aid-jbm11>3.0.co;2-r. PMID: 10397996.

Sanz-Moliner JD, Nart J, Cohen RE, Ciancio SG. The effect of an 810-nm diode laser on postoperative pain and tissue response after modified Widman flap surgery: a pilot study in humans. *J Periodontol*. 2013;84(2):152-158. doi:10.1902/jop.2012.110660.

Sawatjui N, Damrongrungruang T, Leraanansaksiri W, Jearanaikoon P, Limpai boon T. Fabrication and characterization of silk fibroin–gelatin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid scaffold for biomedical applications. *Mater Lett*. 2014 126:207–210. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.04.018>.

Scarpa RC, Carraway RE, Cochrane DE. Insulin-like growth factor (IGF) induced proliferation of human lung fibroblasts is enhanced by neurotensin. *Peptides*. 2005;26(11):2201-2210. doi:10.1016/j.peptides.2005.03.044.

Servoli E, Maniglio D, Motta A, Predazzer R, Migliaresi C. Surface properties of silk fibroin films and their interaction with fibroblasts. *Macromol Biosci*. 2005 Dec 15;5(12):1175-83. doi: 10.1002/mabi.200500137. PMID: 16315185.

Sharma V, Kumar A, Puri K, Bansal M, Khatri M. Application of platelet-rich fibrin membrane and collagen dressing as palatal bandage for wound healing: A randomized clinical control trial. *Indian J Dent Res*. 2019 Nov-Dec;30(6):881-888. doi: 10.4103/ijdr.IJDR\_370\_17. PMID: 31939365.

Silva RAB, Nelson-Filho P, De Oliveira KMH, Romualdo PC, Gatón-Hernandez P, Aires CP, et al. Adhesion and initial colonization of streptococcus mutans is

influenced by time and composition of different composites. *Int J Odontostomat.* 2018; 12(4):395-400.

Stimmelmayer M, Güth JF, Iglhaut G, Beuer F. Preservation of the ridge and sealing of the socket with a combination epithelialised and subepithelial connective tissue graft for management of defects in the buccal bone before insertion of implants: a case series. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2012;50(6):550-555. doi:10.1016/j.bjoms.2011.09.014

Susin C, Haas AN, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Gingival recession: epidemiology and risk indicators in a representative urban Brazilian population. *J Periodontol.* 2004;75(10):1377-1386. doi:10.1902/jop.2004.75.10.1377.

Takeuchi I, Togo C, Makino K. Rebamipide-containing film using chitosan and hpmc for oral mucositis induced by cancer chemotherapy. *Anticancer Res.* 2019 Dec;39(12):6531-6. doi: 10.21873/anticancer.13868. PMID: 31810918

Toffenetti F, Vanini L, Tammaro S. Gingival recessions and noncarious cervical lesions: a soft and hard tissue challenge. *J Esthet Dent.* 1998;10(4):208-220. doi:10.1111/j.1708-8240.1998.tb00359.x.

The American Academy of Periodontology 2001 Annual Report. *J Periodontol.* 2001 Dec;72(12):1801-15. doi: 10.1902/jop.2001.72.12.1801. PMID: 29537521.

Thoma DS, Jones A, Yamashita M, Edmunds R, Nevins M, Cochran DL. Ridge augmentation using recombinant bone morphogenetic protein-2 techniques: an experimental study in the canine. *J Periodontol.* 2010;81(12):1829-1838. doi:10.1902/jop.2010.100161.

Thoma DS, Sancho-Puchades M, Ettl DA, Hämmerle CH, Jung RE. Impact of a collagen matrix on early healing, aesthetics and patient morbidity in oral mucosal wounds - a randomized study in humans. *J Clin Periodontol.* 2012;39(2):157-165. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01823.x.

Thoma DS, Naenni N, Figuero E, Hämmerle CHF, Schwarz F, Jung RE, et al. Effects of soft tissue augmentation procedures on peri-implant health or disease: A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29 Suppl 15:32-49. doi:10.1111/clr.13114.

Thomadaki K, Bosch J, Oppenheim F, Helmerhorst E. The diagnostic potential of salivary protease activities in periodontal health and disease. *Oral Dis.* 2013;19(8):781-788. doi:10.1111/odi.12069.

Tonetti MS, Cortellini P, Pellegrini G, Nieri M, Bonaccini D, Allegri M, et al. Xenogenic collagen matrix or autologous connective tissue graft as adjunct to coronally advanced flaps for coverage of multiple adjacent gingival recession: Randomized trial assessing non-inferiority in root coverage and superiority in oral health-related quality of life. *J Clin Periodontol.* 2018;45(1):78-88. doi:10.1111/jcpe.

Um IC, Kweon HY, Park YH, Hudson S. Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. *Int J Biol Macromol*. 2001 Aug 20;29(2):91-7. doi: 10.1016/s0141-8130(01)00159-3. PMID: 11518580.

van Eekeren P, van Elsas P, Tahmaseb A, Wismeijer D. The influence of initial mucosal thickness on crestal bone change in similar macrogeometrical implants: a prospective randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2017;28(2):214-218. doi:10.1111/clr.12784.

Vasvani S, Kulkarni P, Rawtani D. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. *Int J Biol Macromol*. 2020 May 15;151:1012-1029. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.066. Epub 2019 Nov 9. PMID: 31715233.

Wang L, Nan X, Hou J, Xia Y, Guo Y, Meng K, et al. Preparation and biological properties of silk fibroin/nano-hydroxyapatite/hyaluronic acid composite scaffold. *Biomed Mater*. 2021 Jun 25;16(4). doi: 10.1088/1748-605X/ac08aa. PMID: 34098538.

Wang RE, Lang NP. Ridge preservation after tooth extraction. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23 Suppl 6:147-156. doi:10.1111/j.1600-0501.2012.02560.x.

Wessel JR, Tatakis DN. Patient outcomes following subepithelial connective tissue graft and free gingival graft procedures. *J Periodontol*. 2008;79(3):425-430. doi:10.1902/jop.2008.070325.

Weska RF, Vieira Jr. WC, Nogueira G, Beppu MM. Effect of freezing methods on the properties of lyophilized porous silk fibroin membranes. *Mat Res*. 2009;12(2):233-7. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392009000200020>

Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs*. 2015 Mar 2;13(3):1133-74. doi: 10.3390/md13031133. PMID: 25738328; PMCID: PMC4377977.

Yucel T, Lovett ML, Kaplan DL. Silk-based biomaterials for sustained drug delivery. *J Control Release*. 2014 Sep 28;190:381-97. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.05.059. Epub 2014 Jun 5. PMID: 24910193; PMCID: PMC4142080.

Zhang C, Song D, Lu Q, Hu X, Kaplan DL, Zhu H. Flexibility regeneration of silk fibroin in vitro. *Biomacromolecules*. 2012 Jul 9;13(7):2148-53. doi: 10.1021/bm300541g. Epub 2012 Jun 5. PMID: 22632113; PMCID: PMC3393754.

Zhong SP, Zhang YZ, Lim CT. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010 Sep-Oct;2(5):510-25. doi: 10.1002/wnan.100. PMID: 20607703.

Zhou CZ, Confalonieri F, Jacquet M, Perasso R, Li ZG, Janin J. Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins*. 2001 Aug 1;44(2):119-22. doi: 10.1002/prot.1078. PMID: 11391774.

Zhou F, Zhang X, Cai D, Li J, Mu Q, Zhang W, et al. Silk fibroin-chondroitin sulfate scaffold with immuno-inhibition property for articular cartilage repair. *Acta Biomater*. 2017 Nov;63:64-75. doi: 10.1016/j.actbio.2017.09.005. Epub 2017 Sep 7. PMID: 28890259.

Zhou J, Zhang B, Shi L, Zhong J, Zhu J, Yan J, et al. Regenerated silk fibroin films with controllable nanostructure size and secondary structure for drug delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014 Dec 24;6(24):21813-21. doi: 10.1021/am502278b. Epub 2014 May 29. PMID: 25536875.

Zucchelli G, Sharma P, Mounssif I. Esthetics in periodontics and implantology. *Periodontol 2000*. 2018;77(1):7-18. doi:10.1111/prd.12207