

ANA LAURA DESTRO CHAGAS

Membranas de Látex Natural com colágeno para o tratamento de úlceras por
pé diabético

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano
Co-orientadora: Profa. Dra. Amanda dos Santos
Oliveira

Araraquara

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

C426m Chagas, Ana Laura Destro
Membranas de látex natural com colágeno para o
tratamento de úlceras por pé diabético / Ana Laura Destro
Chagas. – Araraquara : [s.n.], 2021
122 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Rondinelli Donizetti Herculano
Coorientador: Amanda dos Santos Oliveira

1. Materiais biomédicos. 2. Látex. 3. Colágeno.
4. Biocompatibilidade. 5. Diabetes Mellitus. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Membranas de Látex Natural com colágeno para o tratamento de úlceras por pé diabético

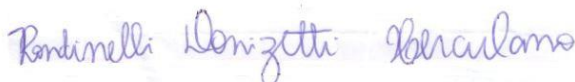
AUTORA: ANA LAURA DESTRO CHAGAS

ORIENTADOR: RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO

COORIENTADORA: AMANDA DOS SANTOS OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas -
UNESP - Araraquara



Prof. Dr. RICARDO JOSÉ MENDONÇA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM – Uberaba - MG



Prof. Dr. THIAGO ANTONIO MORETTI DE ANDRADE (Participação Virtual)
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras / UNIARARAS - Araras



Araraquara, 09 de junho de 2021

DADOS CURRICULARES

Nome: Ana Laura Destro Chagas

Nome em citações bibliográficas: CHAGAS, A. L. D.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Núcleo de Proteômica

Rodovia Araraquara Jaú, Km 01 - s/n

Campos Ville - Araraquara/SP

14800-903

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Bacharel em Biomedicina, Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Mestranda em Biotecnologia, Instituto de Química (UNESP)

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos:

ALMEIDA, G. F. B., *et al.* Controlled drug delivery system by fs-laser micromachined biocompatible rubber latex membranes. **Applied Surface Science**. [s.l.], v. 506, n.144762, p. 1-6, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144762>

PEGORIN, G. S., *et al.* Physico-chemical characterization and tissue healing changes by Hancornia speciosa Gomes latex biomembrane. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, [s.l.], prelo, 2020

<https://doi.org/10.1002/jbm.b.34758>

MORISE, B. T. *et al.* Scopolamine loaded in natural rubber latex as a future transdermal patch for sialorrhea treatment. **International Journal of Polymeric**

Materials and Polymeric Biomaterials, [s.l.], v. 68, n. 13, p.788-795, 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00914037.2018.1506984>.

FLORIANO, J. F.; *et al.* Ketoprofen Loaded in Natural Rubber Latex Transdermal Patch for Tendinitis Treatment. **Journal of Polymers and The Environment**, [s.l.], v. 26, n. 6, p.2281-2289, 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10924-017-1127-x>.

FLORIANO, Juliana F. *et al.* Physical, Chemical and Biological Characterization of Natural Rubber Latex Membranes Loaded with Cordia verbenacea DC. Extract. **Current Traditional Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 2, p.140-154, 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/2215083804666180427113645>.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos:

“A study of the release of different concentrations of scopolamine butylbromide with natural latex membrane matrix” no dia 15 de maio 2019 em Águas de Lindóia.

“Efficacy of healing in diabetic foot ulcers using Natural Rubber Latex membrane” no I Encontro de Polímeros Naturais no dia 2 de agosto de 2019 em Araraquara.

Apresentação de trabalho/palestra:

Apresentou os seguintes trabalhos em eventos científicos:

“A study of the release of different concentrations of scopolamine butylbromide with natural latex membrane matrix” na 48ª Reunião Anual SBBq no dia 15 de maio 2019 em Águas de Lindóia.

“Efficacy of healing in diabetic foot ulcers using Natural Rubber Latex membrane” no I Encontro de Polímeros Naturais no dia 2 de agosto de 2019 em Araraquara. Ministrou a palestra intitulada “Membranas de látex natural para a regeneração tecidual: inovação biomédica para cicatrização de feridas” para alunos do 2º ano do curso de Enfermagem da Universidade de Araraquara – UNIARA

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS

Membro titular da banca de apresentação de TCC da aluna Beatriz Morise, do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (2019).

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

I Encontro de Engenharia Tecidual e Biomoléculas 30 de novembro e 1 de dezembro de 2018

48ª Reunião Anual SBBq – 14 a 17 de maio 2019

I Encontro de Polímeros Naturais – 2 e 3 de agosto de 2019

Dedico esse trabalho ao meu avô, Décio, meu pai, Carlos e à minha mãe, Leonilda. Vocês são meu exemplo de superação, determinação, força e resiliência. Obrigada por todo apoio emocional e espiritual.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo amparo e suporte nos momentos difíceis e proteção ao longo da minha jornada.

À minha mãe, Leonilda por me ensinar a ser forte diante das dificuldades, por me mostrar o dom da resiliência e por todo apoio emocional. Te amo incondicionalmente.

Ao meu irmão, Vinícius e familiares pelas palavras ou gestos de apoio.

Ao meu orientador Prof. Rondinelli e à minha co-orientadora, Profa. Amanda, e, por me proporcionarem a execução desse trabalho, o maior desafio da minha vida.

Aos colegas da UNESP: Bianca, Jean, Felipe, Thainá Oliveira, Thainá Venâncio, Josiane, Natan, Giovana e Matheus pela convivência e conhecimento compartilhado. Em especial ao Felipe por sempre estar disponível para me ajudar a finalizar esse projeto.

Às minhas amigas da universidade para a vida, Ana Letícia e Ana Luiza, por compartilhar as dores e as delícias do mestrado acadêmico. Mesmo longe, sempre as mantenho perto em meu coração.

Ao meu parceiro de vida, Jean Carlo, por ser meu suporte nos momentos mais difíceis e vibrar comigo a cada conquista.

Gostaria de fazer um agradecimento especial ao Rodolfo, Cristiane e Diego que gentilmente cederam seu tempo para me auxiliar nos ensaios de Ângulo de contato, MTT e MEV.

À secretária de saúde do município de Araraquara, Eliana e à funcionária Poliana, por abrir as portas para possibilitar a execução desse projeto.

Às unidades básicas de saúde e postos de saúde da família: Jardim Brasília, Vila Xavier, Jardim Brasil, Jardim Paulistano e Santa Angelina, por cederem as salas de curativo e auxiliar em todo o projeto. Em especial, gostaria de agradecer as funcionárias: Fernanda, Cíntia, Aline e Simone.

Finalmente, gostaria de agradecer aos voluntários do projeto. Obrigada por acreditarem no nosso trabalho e por confiar em mim. Sem vocês esse projeto não teria acontecido, sou eternamente grata por fazer parte da história de vocês.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Martin Luther King).

RESUMO

O Diabetes Mellitus é uma doença crônica que causa diversas complicações, afetando vasos sanguíneos e nervos podendo culminar no surgimento de úlceras de membros inferiores. Curativos a base de colágeno são utilizados na cicatrização de úlceras, promovendo a quimiotaxia de fibroblastos. O látex natural é outro biomaterial interessante, utilizado em aplicações biológicas, por possuir propriedades cicatrizantes e angiogênicas. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento físico-químico da membrana de látex e membrana de látex incorporada com colágeno por meio de ensaios como infra-vermelho, ensaio mecânico, ângulo de contato e intumescimento. Também foi avaliado a hemocompatibilidade por meio do ensaio de hemólise e a biocompatibilidade por meio do ensaio de citotoxicidade celular, via MTT. Foram selecionados seis indivíduos diabéticos para a realização de um ensaio clínico piloto. Esse ensaio foi constituído de dois grupos, no qual o G1 recebeu tratamento com membrana de látex natural e o G2 foi tratado com membrana de látex natural com colágeno. Os resultados demonstraram que não houve modificação na estrutura química dos compostos ao adicionar o colágeno ao látex. O colágeno aumentou o ângulo de contato do material, aumentando sua hidrofobicidade. A membrana de látex foi capaz de absorver 4,4% de água em 24 horas enquanto a membrana de látex com colágeno absorveu 9,8% de água no mesmo período. Ambos os materiais possuem características adequadas para a utilização como curativo, sendo flexíveis, hemo e biocompatíveis. A aplicação em diabéticos demonstrou comportamento semelhante entre as membranas sem diferenças significativas quanto ao tempo de tratamento, sendo influenciado por fatores externos como tempo de aparecimento da ferida, cuidados do indivíduo com o curativo e infecções bacterianas. Conclui-se que a membrana de látex natural incorporada com colágeno pode ser utilizada tratamento para úlceras por pé diabético.

Palavras-chave: Membrana; Látex natural; Colágeno; Biocompatibilidade; Diabetes Mellitus.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a chronic disease that causes several complications, affecting blood vessels and nerves, which may culminate in the appearance of lower limb ulcers. Collagen-based dressings are used to heal ulcers, promoting fibroblast chemotaxis. Natural latex is another interesting biomaterial used in biological applications, because of its healing and angiogenic properties. The aim of this study was to evaluate the physicochemical behavior of latex membrane and latex membrane incorporated with collagen through tests such as infrared, mechanical test, contact angle and swelling degree. Hemocompatibility was also evaluated through the hemolysis assay and biocompatibility through the cell cytotoxicity assay, via MTT. Six diabetic people were selected to carry out a clinical trial. This trial consisted of two groups, in which G1 was treated with natural latex membrane and G2 was treated with natural latex membrane with collagen. The results showed that there was no change in the chemical structure of the compounds when adding collagen to latex. Collagen increased the contact angle of the material, increased its hydrophobicity. The latex membrane was able to absorb 4,4% of water in 24 hours while the latex membrane with collagen absorbed 9,8% of water in the same time course. Both materials have characteristics suitable for use as dressings, being flexible, hemocompatible and biocompatible. The application in diabetic wounds showed a similar behavior between the membranes without significant differences regarding the treatment time, being influenced by external factors such as time of appearance of the wound, care of the individual with the dressing and bacterial infections. It is concluded that the natural latex membrane incorporated with collagen can be used to treat diabetic foot ulcers.

Key Words: Membrane; Natural latex; Collagen; Biocompatibility; Diabetes Mellitus.

Lista de Figuras

Figura 1: Diagrama de formação da lesão do pé diabético	20
Figura 2: Fases da cicatrização.....	21
Figura 3: Formação de capilares sanguíneos a partir de um vaso pré-existente	23
Figura 4: Pirâmide etária do Brasil ao longo dos anos. A figura mostra o estreitamento da base e alargamento do topo com o passar do tempo, indicando o envelhecimento da população.....	28
Figura 5: Estrutura tridimensional do colágeno	31
Figura 6: Imagem de uma "sangria", onde se fazem cortes transversais no caule de seringueira para extrair o látex natural	34
Figura 7: a) Estrutura do poli(cis-1,4-isopreno); b) Partícula de látex natural estabilizada por fosfolipídios e proteínas.	34
Figura 8: Fotografias da membrana cório alantóide: (A) controle negativo (B) destacado o efeito do tratamento com soro de látex natural, evidenciando a angiogênese.....	37
Figura 9: Imagens de um voluntário do estudo recebendo o tratamento com a membrana de látex natural.....	38
Figura 10: Sistema Rapha móvel proposto pelo estudo. Em a) O kit fornecido a cada participante do estudo, incluindo solução salina, bandagens, manual de instruções, o equipamento RLT, biomembranas e uma bolsa; b) O dispositivo de LED vermelho; c) Exemplo de um participante do estudo utilizando o protocolo do sistema Rapha	39
Figura 11: Esquema de confecção de membrana de látex natural	43
Figura 12: Esquema de confecção da membrana de látex natural incorporada com colágeno.....	44
Figura 13: Esquema de cálculo de área das úlceras (mm ²) utilizando o software ImageJ	52
Figura 14: Espectros FTIR da membrana de látex natural + colágeno, colágeno hidrolisado e látex natural.	57
Figura 15: Curva de tensão e deformação da Membrana de Látex e Membrana de Látex + Colágeno.	59
Figura 16: Fotografias da análise de ângulo de contato para as membranas de (a) látex natural e (b) látex natural com colágeno.	62

Figura 17: Cinética de intumescimento:	64
Figura 18: Micrografias da membrana de látex natural nos aumentos de (a) 50x e (b) 100x	65
Figura 19: Micrografias da membrana de látex natural com colágeno nos aumentos de (a) 50x e (b) 100x	66
Figura 20: Resultado da hemólise em a) após 24 horas de incubação, onde o primeiro microtubo é o controle positivo (evidenciando a hemólise) e os restantes são controle negativo, Látex e Látex + Colágeno, respectivamente. Em b) imagem ampliada dos poços contendo o sobrenadante retirado dos microtubos para leitura da absorbância.	68
Figura 21: Gráfico da viabilidade celular (%) em relação ao tempo (horas)	70
Figura 22: Registro fotográfico do seguimento clínico do participante L1	77
Figura 23: Registro fotográfico do seguimento clínico do participante L2	79
Figura 24: Registro fotográfico do seguimento clínico do participante L2 ²	79
Figura 25: Registro fotográfico do seguimento clínico do participante L3 e L3 ²	81
Figura 26: Registro fotográfico do seguimento clínico do participante LC1.....	83
Figura 27: Registro fotográfico do seguimento clínico do participante LC2.....	84
Figura 28: Registro fotográfico do seguimento clínico do participante LC3.....	85

SUMÁRIO

1 Introdução	16
1.1 Diabetes Mellitus	17
1.1.1 Epidemiologia do Diabetes Mellitus.....	17
1.1.2 Diabetes Mellitus	18
1.1.3 Critérios para diagnóstico.....	18
1.1.4 Complicações macroangiopáticas e microangiopáticas	19
1.2 Úlceras	21
1.2.1 Úlceras Cutâneas	21
1.2.2 Mecanismo de cicatrização	21
1.2.3 Úlceras Crônicas	24
1.2.4 Curativos	25
1.2.5 Custos envolvendo tratamento de úlceras crônicas.....	27
1.3 Biomateriais.....	28
1.3.1 Mercado dos Biomateriais	30
1.4 Colágeno	31
1.5 Látex Natural	33
1.5.1 Látex natural como matriz para liberação sustentada	35
1.5.2 Látex natural utilizado como curativo	36
2. Objetivos	41
2.1 Objetivos Gerais.....	41
2.2 Objetivos Específicos	41
3. Materiais e Métodos	42
3.1 Aquisição de materiais e confecção das membranas	42
3.1.1 Confecção das membranas de látex natural	42
3.1.2 Confecção das membranas de Látex Natural + Colágeno	43
3.2 Caracterização físico-química das membranas de látex natural e látex natural com colágeno.....	44

3.2.1 Espectroscopia de infra-vermelho por transformada de Fourier (FTIR) .	44
3.2.2 Ensaio de resistência mecânica	45
3.2.3 Ângulo de contato da superfície das membranas	45
3.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	45
3.2.5 Intumescimento	46
3.3 Ensaio de toxicidade <i>in vitro</i>	46
3.3.1 Hemólise	46
3.3.2 Cultivo celular	47
3.3.3 Ensaio de citotoxicidade celular (MTT).....	48
3.4 Ensaio clínico	49
3.4.1 Tipo e local de estudo	49
3.4.2 Participantes do estudo	49
3.4.3 Critérios de Inclusão.....	49
3.4.4 Critérios de Exclusão.....	50
3.4.5 Amostra.....	50
3.4.6 Identificação dos grupos.....	50
3.4.7 Confecção das membranas para ensaio clínico	51
3.4.8 Registro e análise de imagem	51
3.4.9 Cuidados com a segurança dos produtos	53
3.4.10 Aplicação da técnica de curativo	53
3.4.11 Procedimento	54
3.4.12 Cálculo do Índice de Cicatrização da Úlcera (ICU)	55
3.5 Análise estatística	55
4. Resultados e discussão.....	57
4.1 Caracterização físico-química das membranas.....	57
4.1.1 Espectroscopia por infravermelho (FTIR).....	57
4.1.2 Ensaio Mecânico	58

4.1.3 Ângulo de contato	61
4.1.4 Intumescimento	63
4.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	65
4.2 Ensaios de toxicidade in vitro	67
4.2.1 Hemólise	67
4.2.3 MTT	69
4.3 Ensaio Clínico	71
4.3.1 Classificação amostral.....	71
4.3.2 Caracterização dos participantes do G1.....	76
4.3.3 Caracterização dos participantes do G2.....	83
4.3.4 Discussão acerca dos casos clínicos	86
6. Conclusões.....	89
7. Perspectivas.....	90
8. Referências	91
ANEXO A	111
ANEXO B.....	115
ANEXO C.....	118

1 Introdução

O Diabetes Mellitus é uma doença mundialmente conhecida e amplamente estudada. É uma doença crônica que atinge milhões de pessoas do mundo, por isso é tão importante. Por ser crônica, os diabéticos sofrem com diversas complicações secundárias ao longo da vida devido ao aumento de glicose no sangue, quando o diabetes não é controlado (FAROUHI e WAREHAM, 2019).

Uma dessas complicações é a neuropatia diabética. Essa condição, culmina no aparecimento de úlceras nos membros inferiores que se tornam crônicas (VOLMER-THOLE E LOBMANN, 2016).

O processo de cicatrização é dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelamento (MARTIN E NUNAN, 2015). Geralmente, as úlceras crônicas se encontram estagnadas na fase inflamatória, o que dificulta a cicatrização por vias naturais do organismo (FRYKBERG E BANKS, 2015).

Para tratar essas úlceras crônicas, existem uma grande variedade de produtos comerciais com diversas funções que auxiliam o organismo a ter uma cicatrização eficiente. Além disso, existem muitos estudos que usufruem das propriedades cicatrizantes de elementos encontrados na natureza, como urucum, gengibre azedo, pele de tilápia e abacaxi (REZENDE, 2018, NASCIMENTO *et al*, 2020 E ATAIDE *et al*, 2017).

Outro foco no tratamento das úlceras crônicas, são os biomateriais poliméricos. O mercado dos biomateriais está diretamente ligado ao desenvolvimento de produtos biotecnológicos para diversos setores da área da saúde, como o setor ortopédico, cardiovascular, cirúrgico e também o de tratamento de úlceras (PIRES, BIEHALZ E MORAES, 2015). Os biomateriais poliméricos possuem várias características interessantes, como bioatividade, biodisponibilidade e biocompatibilidade, também são flexíveis, elásticos e biomiméticos. Biomateriais poliméricos podem ser desenvolvidos a partir de hidrogéis, quitosana, alginato, celulose, glicosaminoglicanas, fibroína de seda, colágeno, látex natural, entre outros (STRATTON *et al*, 2016, RAMOT *et al*, 2016 E HE e BENSON, 2017).

O látex natural, proveniente da seringueira *Hevea brasiliensis* possui atividade cicatrizante, estimulando a produção de novos vasos no leito da úlcera

(angiogênese) e aumentando a permeabilidade vascular, facilitando o recrutamento de células importantes na cicatrização (ROSA *et al*, 2019). Já o colágeno, proteína encontrada em grande parte do corpo humano e componente da matriz extracelular, é um grande aliado na cicatrização, pois promove a formação do tecido de granulação e também dá sustentação para as células se ancorarem no novo tecido que está sendo criado (MAYNE, 2019).

Este estudo uniu as propriedades cicatrizantes de dois biomateriais: o látex natural e o colágeno e criou uma biomembrana alternativa para tratamento em úlceras por pé diabético.

1.1 Diabetes Mellitus

1.1.1 Epidemiologia do Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença que tomou proporções globais, atingindo principalmente a população de nações desenvolvidas e em desenvolvimento. Há 463 milhões de diabéticos no mundo, sendo o tipo 2 o mais diagnosticado, acometendo em média pessoas entre 45 e 64 anos de idade (FOROUHI E WAREHAM, 2019).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), aproximadamente 50% dos casos não são diagnosticados, fator que complica o tratamento e mais importante, aumenta as chances do desenvolvimento de complicações causadas pela doença uma vez que o indivíduo descobre a doença tardiamente. As perspectivas são de que até 2045, haja 628,6 milhões de pessoas com diabetes no mundo (SBD, 2020).

Em 2017, a SBD constatou que no Brasil, 12,5 milhões de pessoas foram diagnosticadas com DM, o colocando assim na posição de número 1 na América Latina e ocupando o 4º lugar no ranking mundial. Aqui, as mulheres são mais acometidas (7% da população brasileira), porém a incidência de homens (5,4% da população brasileira) está aumentando significativamente (SBD, 2020).

1.1.2 Diabetes Mellitus

Segundo a SBD, “Diabetes é uma doença crônica na qual o corpo não produz insulina ou não consegue empregar adequadamente a insulina que produz”. É um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia constante. De acordo com a *American Diabetes Association* (ADA), órgão a quem a Organização Mundial de Saúde (OMS) se baseia, há dois tipos de DM. São eles: “Tipo 1” e “Tipo 2” (FOROUHI E WAREHAM, 2019).

TIPO 1

Responde por 5 a 10% dos casos. Tem origem autoimune, caracterizado pela destruição das células beta do pâncreas, levando a incapacidade do órgão de produzir insulina (SANTOS, 2018; ZACCARDI *et al*, 2015). Pode ser tipo 1A ou 1B (difere na forma com que as células são danificadas) (ZACCARDI *et al*, 2015).

Está relacionado à disfunção hormonal, inflamação, genética, imunidade celular e humoral, fatores ambientais, entre outros e não tem causa primária conhecida (ZACCARDI *et al*, 2015).

TIPO 2

Abrange de 90 a 95% dos indivíduos acometidos, sendo mais comum em adultos. Está ligado ao estilo de vida moderno, sedentarismo e má alimentação e ao envelhecimento da população mundial. Sua etiologia é multifatorial, englobando principalmente predisposição genética e fatores ambientais (ZACCARDI *et al*, 2015; NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011).

Em termos metabólicos, está estritamente relacionado com hipertensão e dislipidemias, que levam ao acúmulo de gordura visceral sendo assim, está relacionado à síndrome metabólica (KORAC *et al*, 2021). DM gestacional e do adulto se enquadram em DM do tipo 2 (BAYNEST, 2015).

1.1.3 Critérios para diagnóstico

O diagnóstico do DM é feito por três tipos de exames laboratoriais realizados com por amostras de sangue. O primeiro deles é a mensuração da

glicemia em jejum (de 8 a 10 horas). Valores iguais ou acima de 126 mg/dL caracterizam um diabético. Também existe o exame de teste oral de tolerância à glicose (TOTG), que, em valores iguais ou acima de 200 mg/dL, acusam DM. Por fim, há o teste de hemoglobina glicada que é a porcentagem de glicose que se liga à hemoglobina. Um valor igual ou maior que 6,5% também indica DM (RIDDLE, 2019 e SBD, 2020).

1.1.4 Complicações macroangiopáticas e microangiopáticas

Quando o diabetes está descompensado, a deficiência de insulina nas células resulta em concentrações aumentadas de glicose no sangue, que por sua vez, podem causar complicações crônicas macroangiopáticas e microangiopáticas (QI, YAN E SUN, 2017).

As complicações macroangiopáticas geralmente possuem origem genética, são causadas por níveis anormais de glicose no sangue e doenças vasculares que acometem grandes vasos. São elas: doença arterial coronariana, o acidente vascular cerebral e a doença arterial periférica (QI, YAN E SUN, 2017). Uma pessoa com diabetes que apresenta esse tipo de complicação, possui 4 vezes mais chances de ir a óbito por doença cardíaca quando comparada a pessoa não diabética (VIDAL, 2009).

As complicações microangiopáticas são aquelas que provocam espessamento no endotélio dos pequenos vasos, dificultando a entrega de nutrientes, oxigênio, aumento na permeabilidade vascular, causando edema e também o estresse oxidativo (NASCIMENTO, PUPE E CAVALCANTI, 2016, CASTRO, 2011 e FERREIRA *et al.*, 2011).

O estresse oxidativo é característico por aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, alterando a função mitocondrial, que uma vez danificada, leva à apoptose (morte celular). Em consequência desses fatores, os diabéticos podem desenvolver retinopatia, nefropatia ou neuropatia (FERREIRA *et al.*, 2011).

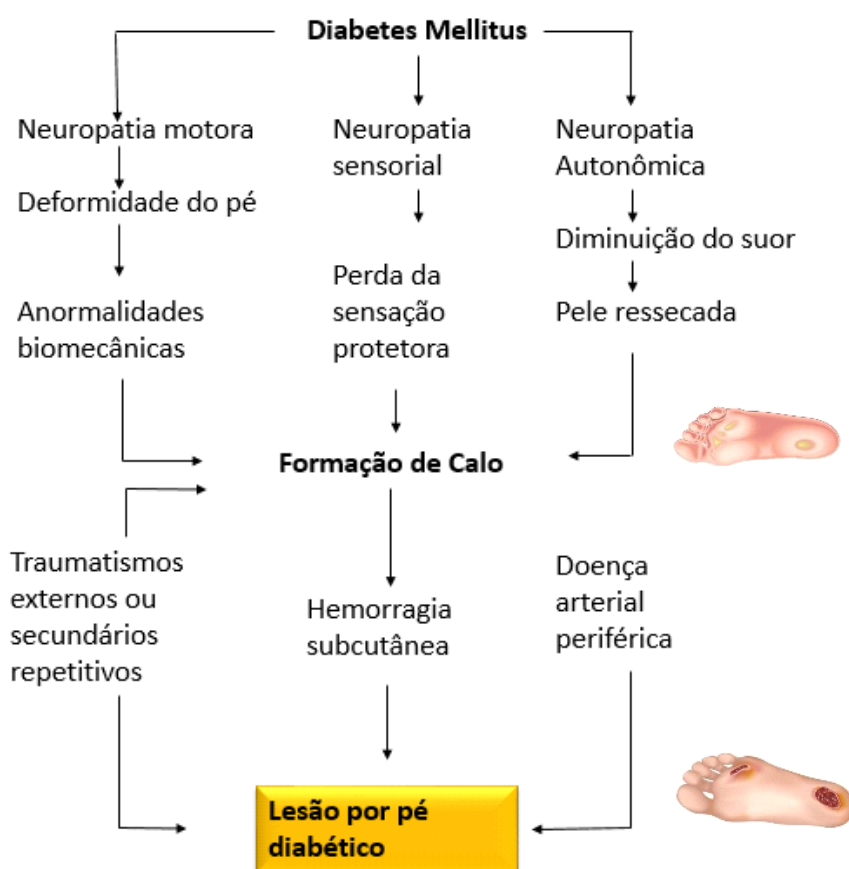
A neuropatia pode ser classificada em sensorial, motora e autonômica periférica. A sensorial provoca a sensação de ardência nos pés, aumentando durante a noite. A neuropatia se torna crônica quando a dor começa a diminuir, levando a perda de sensação protetora dos pés. Neste caso, o indivíduo não

sente dores no membro afetado, ou seja, tem redução de sensibilidade, podendo levar a sérias ulcerações. A neuropatia motora é causada por atrofia nos músculos dos membros inferiores, que resulta em mau posicionamento dos dedos e perda de reflexos musculares (VOLMER-THOLE E LOBMANN, 2016).

A combinação da neuropatia motora e periférica leva a uma marcha desigual e resulta na formação de hiperqueratose (calo) e o indivíduo pode desenvolver o mal perfurante plantar, ou seja, a úlcera por pé diabético propriamente dita (Figura 1). Os locais mais afetados são a área metatarsal 1 e o calcanhar (VOLMER-THOLE E LOBMANN, 2016).

Por fim, a neuropatia autonômica leva à paresia vasomotora que tem como consequência, a redução do suor, que causa ressecamento da pele, sendo suscetível ao aparecimento de úlceras no local (VOLMER-THOLE E LOBMANN, 2016).

Figura 1: Diagrama de formação da lesão do pé diabético



Fonte: Autoria própria.

Como essas complicações estão ligadas à degeneração dos vasos sanguíneos, os diabéticos podem desenvolver ulcerações crônicas nos membros inferiores de difícil cicatrização, que é o foco neste estudo.

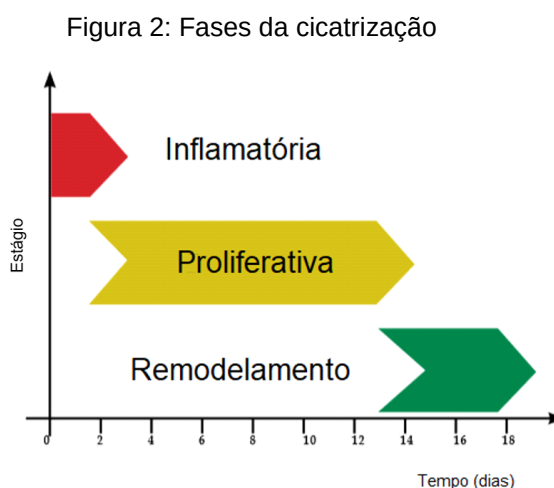
1.2 Úlceras

1.2.1 Úlceras Cutâneas

Úlceras cutâneas são aquelas que comprometem a integridade do tecido, independente da sua extensão, podendo atingir a região subcutânea e tecidos subjacentes. Estas úlceras são mais comuns em adultos, causando impacto socioeconômico, além de influenciar na qualidade de vida do indivíduo (ABBAD E LASTORIA, 2006).

1.2.2 Mecanismo de cicatrização

O processo de cicatrização é complexo e dinâmico, envolvendo vários tipos celulares e mediadores químicos. Pode ser subdividido em três fases que se sobrepõem (MARTIN E NUNAN, 2015) (Figura 2).



Fonte: Gonzalez *et al.* (2016)

Fase inflamatória

Quando se estabelece a lesão tecidual, ocorre a vasoconstrição para evitar o extravasamento sanguíneo. Os primeiros elementos a serem recrutados, são as plaquetas e trombócitos, que induzem a ativação da cascata de coagulação e o recrutamento de outras células. A cascata de coagulação culmina na formação de um tampão hemostático que é uma barreira contra a invasão de microrganismos, além de ser uma proteção para o tecido danificado (MENDONÇA E COUTINHO-NETTO, 2009).

Ocorre também o recrutamento de células pró-inflamatórias como neutrófilos e macrófagos que possuem função de desbridar o local lesionado, induzir a angiogênese, aumentar a permeabilidade vascular, além de secretar citocinas e fatores quimiotáticos, atraindo outros tipos celulares para o local lesionado (GONZALEZ *et al.*, 2016).

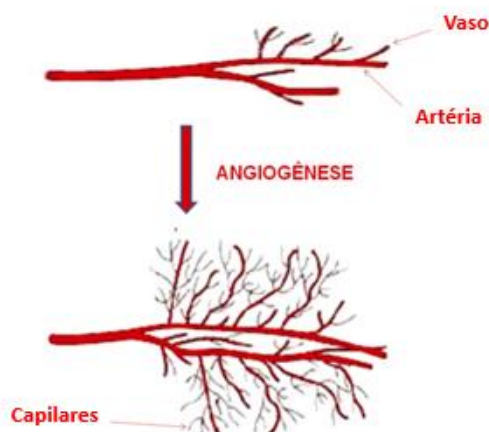
Fase Proliferativa

Essa fase consiste em três grandes eventos: angiogênese, fibroplasia e reepitelização. Tem duração média de 2 a 14 dias após a lesão tecidual.

A angiogênese se inicia após a liberação de fatores de crescimento (FOLKMAN e D'AMORE, 1996 e SORG, 2018). Também são liberados fragmentos de colágeno, fibronectina, elastina, tenascina e laminina na matriz extracelular, que dão suporte para o crescimento de capilares sanguíneos, juntamente com a fibrina produzida no momento da lesão tecidual na coagulação sanguínea (SORG, 2018 e RUOSLAHTI e YAMAGUCHI, 1991).

Resumidamente, a angiogênese se dá pela liberação de fatores de crescimento e componentes teciduais que se ligam a receptores presentes em células endoteliais pré-existentes (Figura 3). Este evento é importante, pois os vasos neoformados transportam oxigênio e nutrientes essenciais para o reparo tecidual (SINGER E CLARK, 1999) e só é possível devido a um aumento na permeabilidade vascular, que possibilita o extravasamento de proteínas para que haja deposição extravascular de fibrina (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009).

Figura 3: Formação de capilares sanguíneos a partir de um vaso pré-existente



Fonte: Adaptado de Miranda (2018)

A partir do 4º dia de estabelecimento da úlcera, o tecido de granulação começa a formar por meio da fibroplasia, responsável por formar a matriz extracelular que dá sustentação para o crescimento do novo tecido (GONZALEZ *et al.*, 2016).

O colágeno é importante na fase de granulação da úlcera, onde a formação da membrana basal intacta entre derme e epiderme é essencial para a reepitelização (BALBINO, PEREIRA E CURI, 2005).

Angiogênese e fibroplasia acontecem simultaneamente, permitindo com que haja nutrição tecidual, fornecimento de oxigênio, recrutamento de células importantes para a cicatrização e suporte para o crescimento celular (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009).

A reepitelização é definida pela proliferação, migração e diferenciação de células epiteliais e queratinócitos no leito da úlcera, com intuito de cicatrização. Este processo ocorre predominantemente das bordas para o centro da úlcera, devido a ação dos fibroblastos e miofibroblastos (SANTORO e GAUDINO, 2005).

Fase de Remodelamento

Esta fase tem início de duas a três semanas após o estabelecimento da úlcera e pode durar por um ano ou mais. Tem como objetivo, recuperar a força tênsil e reorganizar a matriz extracelular. É caracterizado pela maturação de

elementos teciduais e resolução da inflamação inicial (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005).

Nessa fase, há a predominância dos linfócitos, que além de serem células imunitárias, também produzem fatores de crescimento (GONZALEZ *et al.*, 2016).

Assim que uma fina camada de queratinócitos se forma, a migração epidérmica cessa e outras células estratificadas com lâmina basal subjacente, começam a proliferar. O colágeno tipo III é degradado e substituído pelo colágeno tipo I. A disposição das fibras colágenas fica mais fina e em paralelo, justificando sua força tênsil. Quanto mais paralelas e organizadas são essas redes de fibras colágenas, mais resistente é a cicatriz (GONZALEZ *et al.*, 2016).

A cicatriz é formada devido ao desaparecimento de vasos, fibroblastos e células inflamatórias por apoptose ou emigração, permanecendo o colágeno tipo I que foi produzido (ARNOLD e WEST, 1991; (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009), além do aparecimento de folículos pilosos. No entanto, o processo natural de cicatrização pode ser comprometido pela fisiopatogenia do diabetes, por exemplo, causando cronificação das úlceras.

1.2.3 Úlceras Crônicas

Úlceras crônicas são aquelas que apresentam difícil cicatrização ou que estagnaram na fase inflamatória da cicatrização (FRYKBERG E BANKS, 2015)

Não há um consenso sobre o tempo de aparecimento da úlcera para definir como crônica. Alguns autores definem que uma ferida passa a ser crônica após 3 meses, outros relatam ser a partir de 6 meses de aparecimento e ainda há os que indicam a cronicidade da úlcera quando esta não apresenta redução do tamanho após 2 a 4 semanas (OLSSON *et al.*, 2018, MARTINENGO *et al.*, 2019, AFONSO *et al.*, 2013 e KYAW *et al.*, 2017).

Diversos fatores podem influenciar o processo de cicatrização, provocando a cronicidade da úlcera, podendo ser pontuais, como oxigenação, vascularização e infecção da úlcera; ou sistêmicos, como por exemplo, idade, estresse, alcoolismo, tabagismo e DM (FRYKBERG E BANKS, 2015). Para o tratamento dessas feridas, são utilizados curativos com a finalidade de auxiliar o processo de cicatrização.

1.2.4 Curativos

Um curativo é caracterizado como “um meio terapêutico que consiste na limpeza e aplicação de material sobre uma ferida para sua proteção, absorção e drenagem, com o intuito de melhorar as condições do leito da ferida e auxiliar em sua resolução” (SMANIOTTO *et al*, 2012).

São utilizados vários tipos de coberturas comerciais com o objetivo final de cicatrização dessas úlceras. Esses curativos apresentam diversas funções e texturas (placas, gel, creme, espuma, etc.) sendo comum utilizar mais de um método curativo para atingir a reepitelização efetiva da pele. O Quadro 1 resume os curativos mais utilizadas, de acordo com o seu tipo e função.

Quadro 1: Tipos de curativos comerciais utilizados no tratamento de úlceras crônicas.

TIPO	EXEMPLO DE PRODUTOS COMERCIAIS	FUNÇÃO
Hidrocolóide	Aquacel [®] , Comfeel [®] , Duoderm [®] , Granuflex [®] , Tegaserb [®] .	Forma um gel para fornecer um ambiente úmido no leito da úlcera, não necessita trocas constantes, é oclusivo e não indicado para úlceras infectadas.
Hidrogéis	Aquaform [®] , Intrasite Ge [®] , Aquaflo [®] , SAF-gel [®] , Purilon [®] , Restore [®] , Curagel [®] , Carrasyn [®] , Nu-Gel [®] , XCell [®] .	Absorve o exsudato e hidrata a úlcera de acordo com seu nível de umidade.
Espuma (Foam)	Allevyn [®] , Lyofoam [®] , Tielle [®] , Cavicare [®] , Biatain [®] , Tegaderm [®] .	Absorve o exsudato da úlcera e mantém uma superfície úmida.
Alginato	Kaltostat [®] , Sorbalgon [®] , Medihoney [®] , Algisite [®] , Sorbsan [®] , Tegagen [®] .	Forma um gel em contato com a úlcera, que absorve o exsudato.
Hidrofibras	Aquacel Hydrofiber [®] .	Absorve o exsudato das úlceras.
Substitutos de pele artificiais	Biobrane [®] , Bioseed [®] , Dermagraft [®] , Epicel [®] , EZ Derm [®] , Hyalograft [®] , Integra Omnigraft [®] , Laserskin [®] , Myskin [®] , TransCyte [®] , Alloderm [®] , Apligraf [®] , Dermagraft [®] , Oasis [®] .	Induz a migração de fatores de crescimento e citocinas para o local da úlcera.

Fonte: Autoria própria.

Além das terapias comerciais, existem algumas terapias alternativas pelas quais vários pesquisadores investigam o poder cicatrizante de elementos encontrados na natureza, como o urucum (REZENDE, 2018), pele de tilápia (NASCIMENTO *et al.*, 2020), esta última utilizada no auxílio da cicatrização de queimaduras. Também o hidrogel de gengibre amargo (ALMEIDA, 2019) que une propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e vasodilatadoras é utilizado

para a cicatrização de úlceras por pé diabético, evitando a amputação. Pesquisadores também desenvolveram membranas que uniram as propriedades cicatrizantes e antimicrobianas da nanocelulose com as propriedades de desbridamento da bromelina, uma protease encontrada no abacaxi (ATAIDE *et al.*, 2017).

Observa-se que há uma crescente no desenvolvimento de bioprodutos que unem tecnologia com a natureza, sendo mais sustentável e reduzindo os custos de produção, visto que as terapias comerciais possuem um custo elevado.

1.2.5 Custos envolvendo tratamento de úlceras crônicas

Estudos estimam que 15 a 25% dos pacientes diabéticos desenvolverão pelo menos uma ulceração ao longo da vida e mesmo que a úlcera seja cicatrizada, há 30 a 40% de chances dessa úlcera ser recorrente logo no primeiro ano de cicatrização (VAN NETTEN *et al.*, 2016).

As úlceras de membro inferior, são a maior causa de hospitalização entre os diabéticos, o que aumenta significativamente os custos com essa doença (QUILICI, 2016). Os indivíduos diabéticos que apresentam úlcera requerem um investimento cinco vezes mais alto em relação a um diabético sem úlceras. Esses valores englobam o tratamento da úlcera e leva em conta que esse tipo de indivíduo pode ser hospitalizado com mais frequência (TOSCANO *et al.*, 2018).

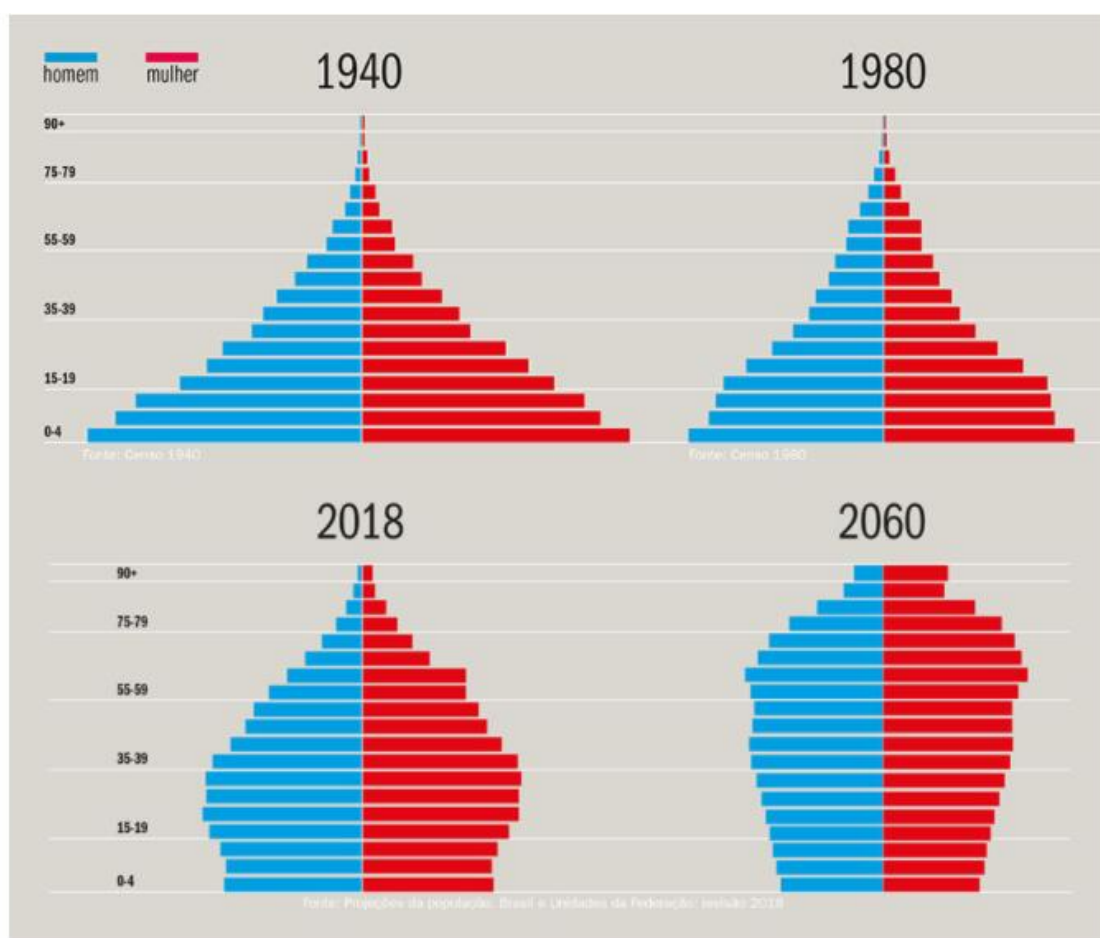
Nos Estados Unidos, o gasto anual com tratamento de úlceras crônicas foi estimado em US\$ 32 bilhões por ano (NUSSBAUM, 2018), sendo em sua maioria, gastos ambulatoriais. Entretanto no Brasil, são gastos aproximadamente 631 milhões de reais, nos quais R\$ 48,4 milhões (13%) são provenientes de hospitais e R\$ 582,9 (87%) são ambulatoriais (TOSCANO *et al.*, 2018). Diante disso, é relevante a investigação de biomateriais que estimulem a cicatrização de lesões em pessoas com diabetes visando melhor qualidade de vida aos pacientes bem como redução dos gastos públicos neste setor.

1.3 Biomateriais

Os biomateriais estão amplamente presentes na área da saúde, melhorando a qualidade de vida do ser humano e sua saúde (HE e BENSON, 2017) e são definidos como “qualquer material utilizado para fazer dispositivos para substituir uma parte ou função do corpo de maneira segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável” (PARK e LAKES, 2007);

Pires, Biehalz e Moraes (2015) atribuem o avanço do uso de biomateriais a três fatores: envelhecimento da população (Figura 4), aumento da expectativa de vida e aumento do poder aquisitivo e padrão de vida das pessoas que vivem em países em desenvolvimento. Devido a esses fatores, é de se esperar um avanço no investimento da tecnologia relacionado a esses bioprodutos.

Figura 4: Pirâmide etária do Brasil ao longo dos anos. A figura mostra o estreitamento da base e alargamento do topo com o passar do tempo, indicando o envelhecimento da população.



Fonte: IBGE (2019).

A área dos biomateriais é multidisciplinar, unindo conhecimentos de ciência dos materiais, biologia, química, engenharia e medicina. Podem ser cerâmicos, metálicos, poliméricos ou compósitos.

Biomateriais poliméricos vêm apresentando destaque no mercado mundial, devido a características adequadas em relação a flexibilidade, elasticidade, inércia biológica, biocompatibilidade e longevidade (PIRES, BIEHALZ E MORAES, 2015).

Estes biomateriais são biomiméticos (capacidade de simular a estrutura tridimensional de um osso, por exemplo), devem apresentar alta biocompatibilidade, o que garante que o composto utilizado não irá causar alguma reação tóxica, prejudicial ou imunológica, além de suportar uma interação célula-biomaterial. Também podem ser bioativos (capacidade de um material afetar seu ambiente biológico, criando estabilidade celular e um ambiente para as células exercerem suas funções) e/ou biodegradáveis. (STRATTON *et al.*, 2016 e RAMOT *et al.*, 2016 e HE e BENSON, 2017).

Devido à variedade de polímeros existentes, e também às suas versatilidades estruturais, os biomateriais poliméricos podem atuar na área oftalmológica, com as lentes de contato, também é amplamente utilizado como implantes dentários, área cardiovascular (stents, válvulas cardíacas), sistemas de liberação sustentada e na área de engenharia tecidual, bem como na forma de curativos para tratamento de feridas. (WEIL e BARZ, 2017). Estes tipos de biomateriais podem ser desenvolvidos a partir de hidrogéis, quitosana, alginato, celulose, glicosaminoglicanas, fibroína de seda, colágeno, látex natural, entre outros.

Monteiro *et al.* (2014) uniram dois componentes da pele, a poli-L-lisina (componente epidérmico) e ácido hialurônico (componente dérmico), utilizando a técnica de montagem camada-por-camada por pulverização, para criar um filme multicamadas com ação cicatrizante. Teste celulares *in vitro* demonstraram que esse biomaterial promove a adesão celular e proliferação de queratinócitos, sendo uma alternativa viável para a regeneração epitelial.

Pesquisadores desenvolveram uma biomembrana a base de látex natural com gentamicina incorporada a fim de utilizar como curativo, unindo propriedades angiogênicas e cicatrizantes do látex natural com as propriedades antibacterianas da gentamicina, antibiótico de amplo espectro. A gentamicina foi

liberada da matriz de látex natural de maneira sustentada. Testes *in vitro* e biológicos demonstraram que a matriz não modificou as propriedades antimicrobianas do fármaco e a biomembrana se mostrou biocompatível, sendo um curativo promissor e de baixo custo para feridas infectadas (GEMEINDER *et al*, 2020).

1.3.1 Mercado dos Biomateriais

A tendência é de grande avanço na área de biomateriais nos próximos anos, com investimentos na área de polímeros médicos de cerca de US\$ 1 bilhão, com tendência de crescimento de 10 a 20% ao ano (HE e BENSON, 2017).

Pires, Biehalz e Moraes (2015), fizeram um estudo no qual, os gastos com biomateriais em 2012 eram de US\$ 44 bilhões e em 2017, a previsão era de US\$ 88,4 bilhões, com a expectativa que esse valor crescesse 22,1% ao longo dos anos, sendo liderado ainda pela América do Norte, Europa e Ásia, com destaque para a Índia.

Mundialmente, os biomateriais metálicos são os que recebem maiores investimentos. Em 2017 foram gastos US\$ 33.7 bilhões e estima-se que esse número pode chegar a US\$ 77 bilhões em 2023, com um crescimento anual de 14,3%. No entanto, o investimento em biomateriais poliméricos está aumentando rapidamente, o que pode fazer com que o crescimento anual desses bioprodutos ultrapasse os biomateriais metálicos, chegando a 17% (INDUSTRY EXPERTS, 2018)

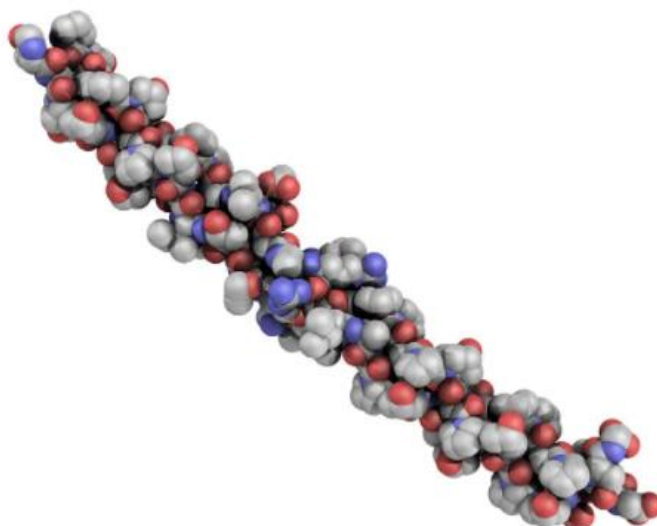
Devido ao envelhecimento da população, aumento da expectativa de vida e com isso, o aumento do índice de doenças cardiovasculares, o investimento em biomateriais no Brasil, é cada vez maior. Os setores que recebem maiores demandas, são: cirurgias plásticas, ortopédicas, tratamento de úlceras, produtos cardiovasculares, urológicos e gastrointestinais (TARKTARE, 2019). Pesquisas demonstram que em 2018, o mercado brasileiro de biomateriais chegou a US\$ 5,1 bilhões e foi apontado um crescimento composto no mercado de biomateriais de 18,3% entre 2017 e 2022 (TARKTARE, 2019).

1.4 Colágeno

O colágeno é uma das principais proteínas encontradas nos animais, utilizado na fabricação de couro, colas, gelatinas tanto comestíveis quanto usadas na indústria farmacêutica (CHATTOPADHYAY e RAINES, 2014). É amplamente presente no ramo cosmético, com objetivo de melhorar a hidratação, elasticidade e rugas na pele (KIM *et al.*, 2018), além das máscaras faciais que também prometem tais benefícios, inclusive rejuvenescimento da pele, uma vez que perdemos colágeno ao longo da vida (NILFOROUSHZADEH, 2018).

O colágeno é uma das proteínas mais abundantes na matriz extracelular da maioria dos tecidos conectivos moles e duros, formando uma grande rede organizada, tridimensional, flexível e dinâmica que dá suporte para as células, promovendo funcionalidade ao tecido (MEYER, 2019). Em termos de estrutura química, o colágeno é composto principalmente por glicina, hidroxiprolina e prolina (Figura 5) (CHATTOPADHYAY e RAINES, 2014; TRACY, MINASIAN e CATERSON, 2016).

Figura 5: Estrutura tridimensional do colágeno



Fonte: Dias (2021).

Além de estar presente em tecidos como ossos, cartilagens e vasos (BARROS, 2020), o colágeno corresponde a cerca de dois terços do peso seco da pele humana, o que o caracteriza como uma proteína de suma importância

para a estrutura epitelial. Os produtos da degradação do colágeno do tipo 1 e 3 induzem a quimiotaxia de fibroblastos humanos, o que acelera o processo de cicatrização (CHATTOPADHYAY e RAINES, 2014; TRACY, MINASIAN e CATERSON, 2016).

O colágeno promove adesão e crescimento celular, pois contém sítios específicos de adesão celular, como arginina-glicina-aspartato. Esse sítio liga receptores de integrina que desempenha um papel importante no crescimento e diferenciação celular e até mesmo, regulando as funções celulares. (TANGSADTHAKUN *et al.*, 2006).

Devido a sua diversidade de funções e importância na pele, aplicações biomédicas de colágeno como um biomaterial começou a ser atraente para os pesquisadores, sendo utilizado como matriz para liberação sustentada de fármacos, na engenharia tecidual, para reparação de tecidos moles e como membrana para diversas aplicações, inclusive em feridas e queimaduras (MAYNE, 2019).

O primeiro uso do colágeno como um biomaterial, foi documentado em 1881, onde Joseph Lister e William Macewen relataram as vantagens de usar um material chamado de “catgut” como sutura biodegradável. Esse material era preparado a partir do intestino delgado de ovelhas, rico em colágeno (CHATTOPADHYAY e RAINES, 2014).

As feridas que recebem curativos a base de colágeno aumentam a formação do tecido de granulação e reepitelização, servindo também como um suporte para o crescimento e diferenciação de células epiteliais, acelerando o processo de reepitelização e tornando-o mais eficaz. Além disso, curativos a base de colágeno possuem vantagem prática e são utilizados de diferentes formas: como membrana oclusiva, na forma de hidrogel ou associando-o a outro produto, formando um compósito. (CHATTOPADHYAY e RAINES, 2014).

No mercado atual, existem vários curativos comerciais que se baseiam no princípio de substitutos de pele à base de colágeno, como Integra®, Biobrane®, Apligraf® e Matriderm®. Esses curativos apresentam bons resultados na clínica (AKTURK *et al.*, 2016).

Edmonds (2009) fez um estudo randomizado no qual selecionou pacientes portadores de úlceras com aproximadamente duas semanas de aparecimento e separou em dois grupos sendo um deles foi tratado com um

derivado da combinação de um gel de colágeno bovino do tipo I com fibroblastos homólogos neonatais e outro que recebeu apenas solução salina. O autor observou que 51,5% dos indivíduos que receberam o primeiro tratamento, obtiveram cicatrização satisfatória contra 26,3% dos pertencentes ao outro grupo.

Haycocks, *et al.* (2013), estudaram 6 indivíduos diabéticos (tipo 2) portadores de neuropatia periférica há aproximadamente 12 meses de aparecimento. Estes sujeitos haviam recebido diversos tipos de tratamento, sem sucesso. Neste trabalho, os autores aplicaram uma matriz de colágeno na úlcera previamente desbridada. Os resultados apresentaram dois grupos distintos: um deles não obteve sucesso na cicatrização, visto que a porcentagem da área da úlcera diminuiu lentamente e ainda em um dos participantes, houve aumento do tamanho da úlcera (provavelmente causado pelo comportamento do próprio indivíduo). O outro grupo apresentou grande diminuição na porcentagem da área, sendo que esses participantes receberam tratamento com antibióticos antes de iniciar o curativo com a matriz de colágeno.

Diante disso, a aplicabilidade do colágeno no campo da cicatrização tem se mostrado interessante. Entretanto, as membranas de colágeno puro podem apresentar limitações decorrentes de sua baixa força mecânica, fraca barreira ao vapor d'água, alta solubilidade em água e rápida biodegradabilidade (SOUZA, 2013). Sendo assim, uma possibilidade de aumentar a resistência do colágeno é associá-lo a outros materiais, formando um compósito, sendo a proposta deste trabalho a de associar o colágeno com o látex natural, agregando as vantagens de ambos no desenvolvimento de uma nova biomembrana cicatrizante.

1.5 Látex Natural

A *Hevea brasiliensis*, é uma planta originária da Amazônia (Figura 6), que ganhou destaque econômico nos séculos XIX e XX devido a extração do seu produto natural: a borracha. É utilizada em larga escala na indústria para a produção de luvas descartáveis, adesivos, preservativos, entre outros, devido às suas propriedades particulares, como flexibilidade, elasticidade, alta impermeabilidade e isolamento elétrico (MENDONÇA, 2008).

Figura 6: Imagem de uma "sangria", onde se fazem cortes transversais no caule de seringueira para extrair o látex natural

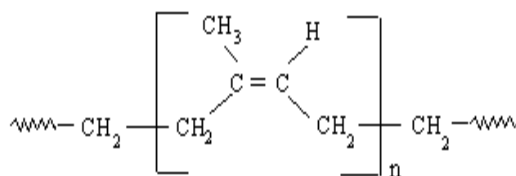


Fonte: Cantanhede (2015)

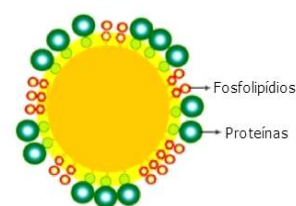
O látex natural é um sistema coloidal constituído principalmente de partículas de poli(cis-1,4-isopreno) (30-45%), responsável pela elasticidade (Figura 7a), envolvidas e estabilizadas por uma fina camada de fosfolípidios e proteínas (Figura 7b) (NAWAMAWAT, 2011). Outros constituintes encontrados no látex são: Proteínas (1-1,8%), carboidratos (1-2%), lípidos neutros (0,4-1,1%), lípidos polares (0,5-0,6%), compostos inorgânicos (0,4-0,6%), aminoácidos e aminas (0,4-0,6%) e água (49-71%) (ANSARI, 2020)

Figura 7: a) Estrutura do poli(cis-1,4-isopreno); b) Partícula de látex natural estabilizada por fosfolípidios e proteínas.

a)



b)



Fonte: NAWAMAWAT *et al.* (2011)

O látex natural tem sido utilizado em aplicações biomédicas por apresentar boa resistência mecânica, flexibilidade, elasticidade etc. Além do mais, este biopolímero tem sido empregado no tratamento de úlceras agudas ou crônicas por apresentar atividade angiogênica e cicatrizante (MRUÉ, 2000; MRUÉ e COUTINHO-NETTO, 2004).

Alguns indivíduos podem desenvolver alergias ao látex utilizado em utilitários como luvas, drenos, preservativos, cateteres urinários, entre outros.

Historicamente, foram observados dois tipos de manifestações alérgicas associadas ao látex natural. Esse material é composto por algumas proteínas que podem desencadear uma reação de hipersensibilidade do tipo 1, que é imediata, mediada por Imunoglobulina E (IgE) (RAULF, 2014 e GAWCHIK, 2011). Para evitar esta manifestação alérgica, o polímero é centrifugado a 8000g a fim de remover do sobrenadante, as proteínas solúveis responsáveis pelas manifestações alérgicas presentes no látex natural (BARROS, 2020).

A outra manifestação alérgica, é causada não pelo látex, mas pelos aditivos químicos, como enxofre, tiurams, carbamatos, mercapto benzotiazoles, aminas e tiocarbonatos utilizados para fabricação de outros materiais, como por exemplo, as luvas de procedimento comumente utilizadas na área da saúde (RAULF, 2014 e GAWCHIK, 2011). Estes aditivos não são utilizados na confecção das biomembranas para fins curativos.

1.5.1 Látex natural como matriz para liberação sustentada

Adesivos transdérmicos são alternativas de aplicabilidade do látex natural, sendo possível a incorporação de fármacos ou compostos para a liberação controlada ao longo do tempo. Esse sistema oferece vantagens como: evitar a passagem do fármaco pelo fígado (diminuindo os danos hepáticos causados por alguns medicamentos), evitar complicações gastrointestinais, manter uma concentração constante de fármaco no sangue por um longo período (PHAECHMUD, 2012, MARWAH *et al.*, 2014).

Florianio *et al.* (2018), incorporaram Cetoprofeno, um potente analgésico e anti-inflamatório utilizado no tratamento de doenças inflamatórias, como artrite reumatoide e adenocarcinoma colônico. Os pesquisadores detectaram que 60% do fármaco foi liberado em 50 horas.

Garms *et al.* (2019), estudaram a liberação e o potencial antibacteriano do Moxifloxacino incorporado em matriz polimérica de látex natural contra bactérias encontradas na pele humana, para utilização em tratamentos de feridas cutâneas. Os resultados mostraram que em 48 horas, 32,4% do fármaco foi liberado em uma solução com pH semelhante ao da pele e que após 295 horas, 65,44% de Moxifloxacino foi liberado em pH 7,4. Além disso, o fármaco incorporado na membrana de látex natural foi capaz de inibir o crescimento dos

microrganismos comumente encontrados na pele, como *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*.

Silva *et al* (2020) incorporou Voriconazol na matriz de látex natural, um antifúngico utilizado no tratamento de úlceras contaminadas com *Candida spp*. Os ensaios de liberação demonstraram que a matriz foi capaz de liberar 13,23% do fármaco em 1 hora, o que corresponde à quantidade de fármaco que se encontrava na parte externa da membrana de látex natural. Após 48 horas, 24,2% do fármaco foi liberada. Ensaaios de macrodiluição demonstraram que a quantidade de fármaco liberada foi eficaz para a inibição do crescimento de *Candida parapsilosis* além disso, foi empregado testes hemolíticos, que demonstraram que no novo bioproduto não causa danos aos eritrócitos.

1.5.2 Látex natural utilizado como curativo

No que tange as aplicações com finalidades reconstrutivas, a primeira utilização do látex natural foi na reconstrução da parede esofágica de cães (MRUÉ, 2000), parede abdominal (MRUÉ, 1996), substituição do pericárdio de cães (SADER *et al*, 2000) e membrana timpânica (OLIVEIRA *et al*, 1999), que comprovaram sua biocompatibilidade e capacidade regenerativa. A partir desses estudos, a literatura tem reportado a utilização da membrana de látex natural na regeneração dérmica, reparo ósseo e na reconstrução de órgãos.

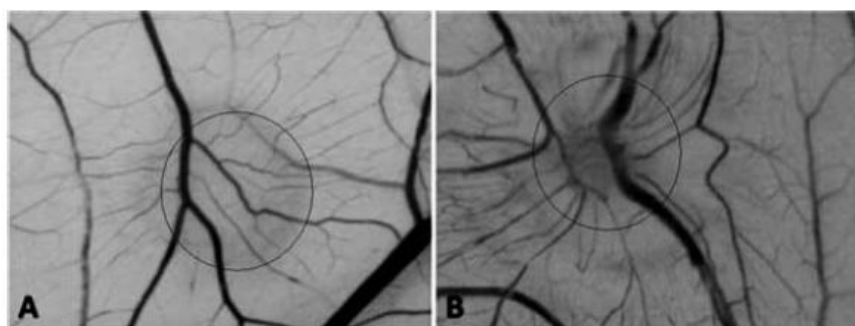
Pinho *et al*. (2004) utilizaram a membrana de látex natural como uma alternativa para reconstrução conjuntival em coelhos, baseados em estudos anteriores, onde a biocompatibilidade do látex natural havia sido demonstrada. O estudo contou com coelhos que receberam tratamento com a membrana de látex natural no olho direito enquanto o olho esquerdo permaneceu com a esclera nua. Ao fim do tratamento, 60% dos olhos tratados com a membrana de látex natural, tiveram recuperação satisfatória contra 20% dos olhos sem tratamento. Além disso, observou-se que o número de vasos sanguíneos presentes por campo óptico, foi o dobro em relação ao grupo controle, detectando a capacidade angiogênica promovida pelo látex natural.

Mendonça *et al*. (2009), estudaram diferentes concentrações do soro do látex natural a fim de entender o mecanismo de cicatrização causado pelo material. Os autores acreditam que o potencial cicatrizante do látex natural está

ligado ao poder angiogênico e sua capacidade de aumentar a permeabilidade vascular, ou seja, os componentes presentes no soro do látex natural induzem o crescimento de novos vasos sanguíneos no local em que é depositado e também permite que uma grande variedade de citocinas e fatores de crescimento alcancem o local danificado.

ANDRADE *et al* (2011) e Mendonça *et al* (2010) avaliaram a capacidade angiogênica promovida pelo látex natural em camundongos e na membrana cório-alantóide do embrião da galinha, respectivamente. Ambos os trabalhos detectaram o aumento de vasos sanguíneos nas regiões onde o látex natural foi aplicado. A angiogênese possui um papel importante na cicatrização, sendo um dos fatores que torna o curativo de látex natural tão relevante (Figura 8).

Figura 8: Fotografias da membrana cório alantóide: (A) controle negativo (B) destacado o efeito do tratamento com soro de látex natural, evidenciando a angiogênese



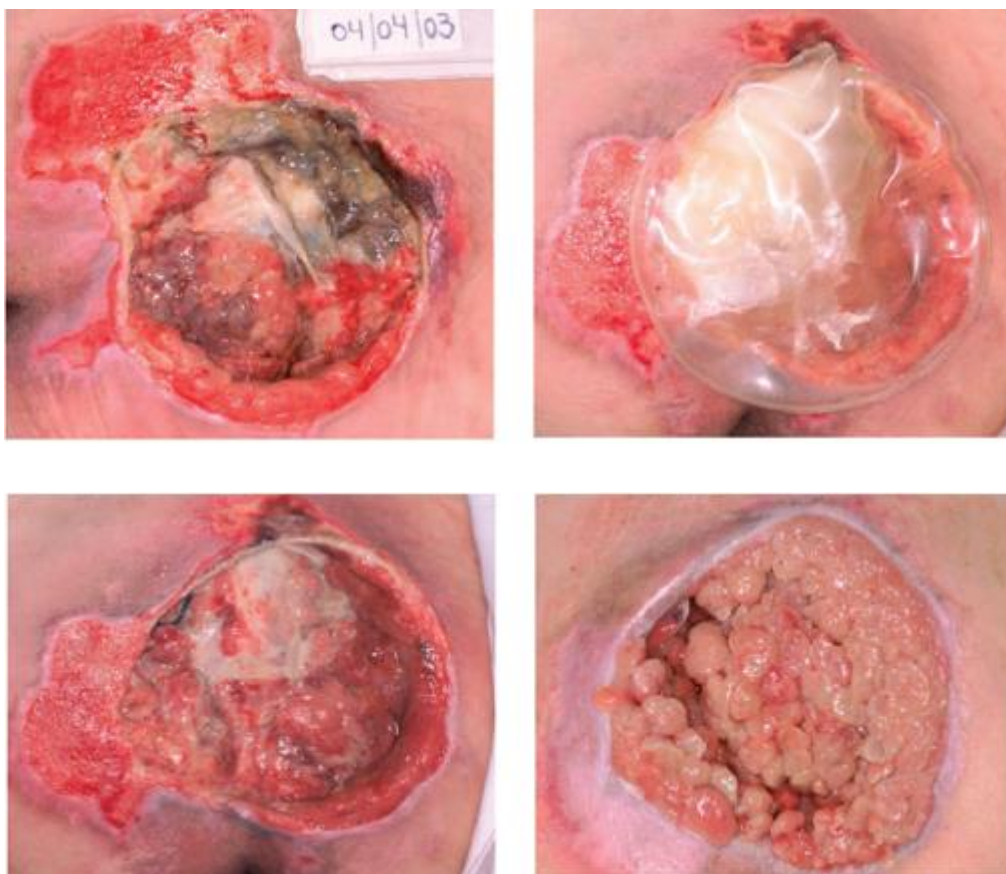
Fonte: Mendonça *et al.* (2010).

A membrana de látex natural (MLN), quando utilizada em úlceras crônicas, tem capacidade de promover desbridamento do leito da úlcera, retirando tecido necrótico e esfacelo, promove intensa exudação, que pode estar relacionado com o aumento da permeabilidade vascular, sendo possível observar a formação de tecido de granulação e finalmente, a angiogênese. São essas características que tornam esse material um atrativo no âmbito da cicatrização, podendo ser utilizado em úlceras crônicas de origem vascular, diabética ou por pressão (FRADE *et al.*, 2006).

Frade *et al.* (2006) avaliaram dois casos de indivíduos acometidos por úlceras de pressão. Ambos os participantes receberam o tratamento com a MLN e foram acompanhados por 6 meses. As úlceras eram localizadas na região sacral e tiveram cicatrização completa antes de completarem 6 meses de

tratamento. Os pesquisadores relataram que a MLN possui capacidade de desbridamento autolítico do leito da úlcera e promove importante estímulo granulogênico, sendo um curativo prático, eficaz e de baixo custo. A Figura 9 exemplifica um dos casos apresentados no estudo.

Figura 9: Imagens de um voluntário do estudo recebendo o tratamento com a membrana de látex natural.



Fonte: Frade *et al.* (2006)

Silva (2017) avaliou a eficácia e segurança do tratamento das úlceras crônicas com a utilização da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* incorporada com extrato de *Stryphnodendron barbatimam* Mart (barbatimão). Os resultados mostraram que 37,5% dos participantes do grupo que utilizou apenas membranas de látex, obtiveram sucesso na cicatrização completa da úlcera em 90 dias, enquanto 46,7% dos participantes que utilizaram o curativo com a matriz de látex+barbatimão tiveram suas feridas completamente reepitelizadas no tempo proposto. Este estudo deu origem a patente de um novo

bioproduto: a membrana de látex incorporada com barbatimão, com o objetivo de cicatrizar feridas crônicas unindo o potencial cicatrizante dos dois compostos naturais (Silva, 2017).

Rosa *et al.* (2019) desenvolveram um sistema chamado Rapha® (Figura 10), constituído de uma MLN e uma matriz emissora de LED vermelho e o aplicaram em úlceras por pé diabético em três ambientes diferentes: o primeiro grupo GI, teve o sistema Rapha® aplicado pelo participante e profissional de saúde, o grupo GII, utilizou o protocolo de saúde utilizado no Brasil estabelecido em hospital (controle) e o grupo GIII teve o sistema Rapha® aplicado em domicílio pelo próprio participante da pesquisa. Os resultados foram respectivamente de 77%, 51% e 80%, mostrando que os participantes tratados com o sistema Rapha® obtiveram maiores taxas de reepitelização mesmo quando aplicado em ambiente domiciliar (ROSA *et al.*, 2019).

Figura 10: Sistema Rapha móvel proposto pelo estudo. Em a) O kit fornecido a cada participante do estudo, incluindo solução salina, bandagens, manual de instruções, o equipamento RLT, biomembranas e uma bolsa; b) O dispositivo de LED vermelho; c) Exemplo de um participante do estudo utilizando o protocolo do sistema Rapha



Fonte: Rosa *et al.* (2019)

Krupp *et al.* (2019) realizaram um estudo *in vivo*, no qual curativos foram aplicados para tratamento de queimaduras de segundo grau, constituídos de látex natural e extrato aquoso de própolis que reúne propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomodulatórias, analgésicas, antibacterianas e antifúngicas, além de estimular a produção de colágeno, proporcionando a cicatrização em camundongos com queimaduras. Os resultados mostraram que o curativo induziu a cicatrização por meio da produção de colágeno e promoveu a angiogênese. Neste estudo, as biópsias mostraram menor número de células inflamatórias, caracterizando o aparecimento do epitélio. Sendo assim as membranas de látex natural com própolis se mostraram uma ótima alternativa para o tratamento de queimaduras.

Um estudo desenvolveu uma blenda polimérica unindo propriedades cicatrizantes do látex natural e do colágeno para terapias regenerativas e/ou engenharia de tecidos. O autor demonstrou que esse novo material apresentou biocompatibilidade *in vitro* quando aplicada em fibroblastos e queratinócitos. Além disso, também foi mostrado que o látex natural aumenta a proliferação de fibroblastos em 187% a cada 24 horas e quando foi acrescentado o colágeno à membrana de látex, a produção de queratinócitos aumentou em 122% em 24 horas, mostrando que esta nova membrana látex-colágeno auxilia na neoformação tecidual (BARROS, 2020).

Deste modo, este trabalho visa unir as propriedades cicatrizantes do látex natural e do colágeno, um polímero presente no corpo humano, sendo biocompatível e biorreabsorvível, criando um compósito em forma de biomembrana, a fim de utilizar na aplicação de curativos para o tratamento de úlceras diabéticas, na forma de estudo clínico com número amostral reduzido.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo deste estudo foi caracterizar membranas de látex natural com colágeno e também realizar a aplicação clínica, por meio de um projeto piloto com número amostral reduzido em indivíduos diabéticos com feridas crônicas de membros inferiores, atendidos nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) do município de Araraquara-SP.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar e avaliar as propriedades físico-químicas das membranas de látex com colágeno
- Caracterizar e analisar a hemocompatibilidade e biocompatibilidade das membranas de látex com colágeno por meio de ensaios hemolíticos e de citotoxicidade celular.
- Avaliar as possíveis evoluções relacionadas ao aspecto, tamanho e tecido das úlceras nos grupos estudados.

3. Materiais e Métodos

Este trabalho foi realizado em duas etapas: a primeira etapa é composta pela confecção das membranas utilizadas no estudo, caracterização físico-química dos materiais e ensaios de hemocompatibilidade e biocompatibilidade. A segunda etapa é dada pelo ensaio clínico com participantes da pesquisa que visou avaliar o desempenho da membrana nas úlceras em pé diabético, comparando os resultados com a membrana de látex natural já existente.

Etapas 1

3.1 Aquisição de materiais e confecção das membranas

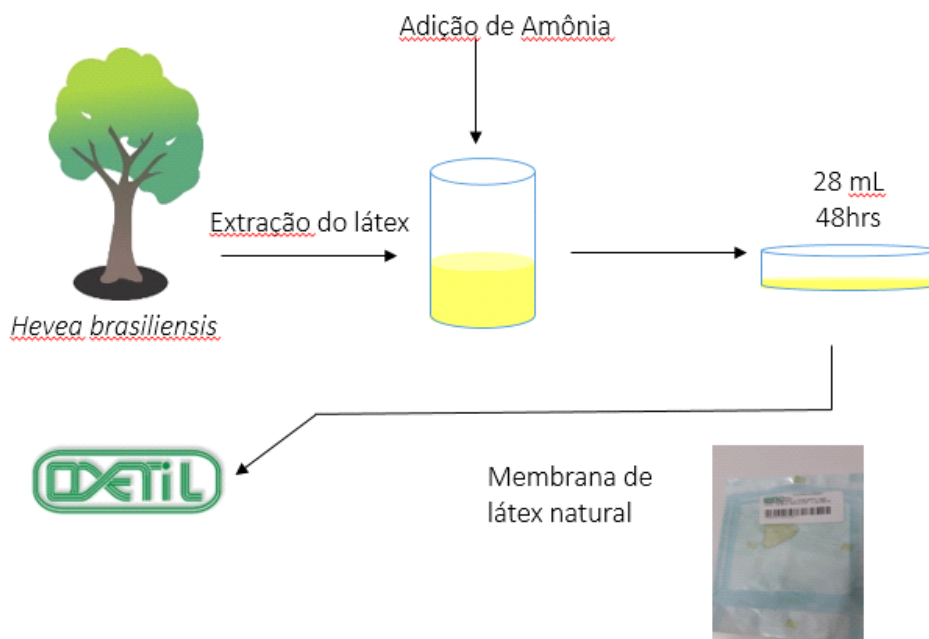
O látex natural utilizado neste trabalho foi adquirido da BDF Comércio de Produtos Agrícolas Ltda, Guarantã – SP. Para manter o material em estado líquido, foi adicionado hidróxido de amônio, corrigindo a acidez e estabilizando o meio ao pH igual a 10,2 (MORISE *et al.*, 2020). Após este processo, o látex natural foi submetido à centrifugação de 8000g, com a finalidade de reduzir a quantidade de proteínas responsáveis por reações de hipersensibilidade. Essas proteínas são de alto peso molecular e solúveis em água. (BARROS *et al.*, 2020).

O colágeno utilizado no trabalho foi o colágeno em pó hidrolisado de origem bovina tipo 1, de lote interno número 18A12-B056-028181, lote fabricante 2205159, com pH medindo 5,84 adquirido comercialmente na Farmácia Arte & Ciência (Araraquara-SP).

3.1.1 Confecção das membranas de látex natural

As membranas de látex natural foram confeccionadas pelo método de “casting” depositando 28 mL de látex natural líquido em uma placa de Petri de 14 cm de diâmetro. Aproximadamente 48 horas depois, a água e amônia contidas no látex evaporaram e a mistura se polimerizou, dando origem as membranas com 1 mm de espessura. A Figura 11 ilustra a confecção das membranas.

Figura 11: Esquema de confecção de membrana de látex natural



Fonte: Autoria própria.

3.1.2 Confecção das membranas de Látex Natural + Colágeno

A confecção dessas membranas seguiu o protocolo desenvolvido por Barros (2020) nas seguintes proporções: 125 mg de colágeno em 1,25 mL de H₂O destilada + 1,9 mL de látex, com adaptações para que as membranas atingissem 1 mm de espessura nas diferentes formas de silicone utilizadas neste estudo.

Após 48 horas, a água e amônia contidas na mistura evaporaram e a mistura se polimerizou, dando origem as membranas com 1mm de espessura (BARROS, 2020). A Figura 12 ilustra a confecção das membranas.

Figura 12: Esquema de confecção da membrana de látex natural incorporada com colágeno.



Fonte: Autoria própria.

3.2 Caracterização físico-química das membranas de látex natural e látex natural com colágeno

3.2.1 Espectroscopia de infra-vermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos usando um Espectrômetro FTIR – TENSOR 27/BRUKER. As amostras foram analisadas por meio da técnica de reflexão totalmente atenuada (ATR). Os espectros foram realizados na faixa de absorção de $4000-400\text{cm}^{-1}$, com porcentagem de transmitância (%T) e acúmulo de 32 varreduras com uma resolução de 4 cm^{-1} ; fonte: Laser de HeNe e Detector: DLaTGS. Este equipamento fica alocado no Grupo de Bioengenharia e Biomateriais da FCF/UNESP de Araraquara.

3.2.2 Ensaio de resistência mecânica

Os testes de tração das membranas foram realizados em quintuplicata até sua ruptura, utilizando uma máquina de ensaio mecânico EMIC modelo DL 2000 com célula de carga de 50 Kgf e velocidade de 500 mm/min à temperatura ambiente. As membranas utilizadas nestes ensaios foram confeccionadas em moldes retangulares medindo 30 mm de comprimento e 25 mm de largura. A média de espessura das membranas de látex natural foi de 0,98 mm ($DP \pm 0,07$) e a espessura das membranas de látex incorporada com colágeno teve média de 1,01 mm ($DP \pm 0,02$).

3.2.3 Ângulo de contato da superfície das membranas

O ângulo de contato foi mensurado por um equipamento Dataphysics modelo OCA-20 equipado com uma câmera CCD. O método utilizado para realizar as medidas foi o de gotejamento utilizando água deionizada (tensão superficial: 72,30 mN/m²); a gota foi dispensada por uma seringa SNP – D091/060 com uma agulha de 0,5 mm de diâmetro, com um volume de 17 µL, em uma velocidade de gotejamento de 0,5 µL/s sobre as superfícies das membranas (SASKA, 2012). O software SCA20 foi utilizado para mensurar o ângulo de contato formado pela gota na superfície do material em estudo por meio da fotografia registrada.

As medidas para ângulo de contato foram realizadas após 30s para avaliar a molhabilidade das membranas (MIRANDA, 2018). Cada membrana foi submetida a 7 medições cada.

Quanto menor o ângulo formado entre a superfície da membrana e a gota d'água, maior é sua molhabilidade, indicando que o material é hidrofílico e vice-versa (SASKA, 2012).

3.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A técnica de MEV foi utilizada por permitir a observação da morfologia da superfície das amostras, o tamanho e a distribuição dos compostos no material (MOHAMMED e ABDULLAH, 2018). As imagens de MEV foram obtidas nas

ampliações de 50× e 100× utilizando um Microscópio de Varredura de Alta Resolução (FEG-MEV; JEOL modelo 7500F) com 2 kV, ângulo do feixe 35° e carbono foi utilizado como material condutor para o recobrimento das amostras. O equipamento é localizado no Laboratório de Microscopia Avançada (LMA) no prédio Multiusuários do Instituto de Química da UNESP – Araraquara.

3.2.5 Intumescimento

Para a caracterização do grau de intumescimento (GI), as amostras previamente pesadas foram incubadas em 200 mL de água deionizada em temperatura ambiente, após hidratação, as membranas foram retiradas da solução por períodos determinados (5, 20, 30 60, 90, 120, 150,180, 210, 240 min, 20, 22, 23 e 24 h), rapidamente secas com papel de filtro com a finalidade de remover o excesso de água da superfície e pesadas logo em seguida. O GI foi avaliado no tempo a partir da variação de massa das amostras, empregando a Equação 1 (AKTURK et al., 2011; JAYAKUMAR et al., 2012; TANODEKAEW et al., 2004). O experimento foi conduzido em triplicata.

$$GI = \frac{(M_i - M_0) \times 100}{M_0} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

GI = grau de intumescimento (%),

M_0 = massa inicial,

M_i = massa úmida no tempo.

3.3 Ensaio de toxicidade *in vitro*

3.3.1 Hemólise

Este ensaio avalia o potencial hemolítico de um material, ou seja, a capacidade de romper as membranas das hemácias. Este estudo avaliou a

capacidade hemolítica de e membranas de látex natural com e sem colágeno (SILVA *et al*, 2020; CESAR *et al*, 2020).

O protocolo utilizado no ensaio hemolítico seguiu a norma ISO10993 parte 4 (*Internacional Standard Organization*). Utilizou-se 5 mL de sangue de carneiro com 3,8% (m/v) de citrato de sódio como anticoagulante (na proporção de 9:1, sangue/citrato). Em seguida a mistura foi lavada três vezes com solução salina 0,9%, e centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante.

Membranas de 6 mm de diâmetro foram incubadas em contato direto com 1mL solução de 5% de eritrócitos (v/v, solução salina 0,9%(m/v)) por 24 h a 37°C. No controle negativo (CN) não foi adicionado material e como controle positivo (CP) foi utilizado detergente Tween.

Prosseguiu-se com a centrifugação das amostras à 1000 rpm por 10 minutos, transferiu-se 100 µL do sobrenadante para placa de 96 poços e a densidade óptica (DO) foi medida em leitora de microplaca sob 540 nm. O experimento foi realizado em quintuplicata sendo calculada a porcentagem de hemácias com base na equação 2:

$$Hemólise (\%) = \left(\frac{amostra-CN}{CP-CN} \right) * 100 \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde:

Amostra – equivale a amostra a ser avaliada.

CN - Controle Negativo (0%)

CP – Controle Positivo (100%)

3.3.2 Cultivo celular

As células de fibroblasto, linhagem 3T3, foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ/UFRJ. Estas células foram cultivadas utilizando meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e 1% de antimicótico e antibiótico, e 3 g/L de glicose. O cultivo foi incubado em estufa a 37°C e 5% de CO₂ com trocas de meio de

cultura a cada 48 horas. A célula foi dissociada com solução de tripsina ao atingir a confluência de 60-80%.

3.3.3 Ensaio de citotoxicidade celular (MTT)

Neste projeto realizou-se a técnica utilizando o reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolium brometo) para o ensaio de avaliação da viabilidade celular de acordo com o descrito por Mosmann (1983) e seguindo as recomendações da norma ISO 10993-5. O MTT é um sal amarelo que é clivado somente por células vivas e metabolicamente ativas, formando um precipitado roxo insolúvel em água (formazan). Neste ensaio, utilizaram-se placas de 24 poços contendo em cada poço cerca de 2×10^4 células/mL.

Após o plaqueamento das células, as placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂ para que ocorresse a adesão das células. Depois, foram adicionados nos poços os discos de 6 mm de diâmetro da membrana de látex natural e membranas de látex natural com colágeno. Os ensaios foram feitos em quintuplicata. O controle negativo foi realizado expondo as células apenas ao meio de cultura e o branco refere-se aos poços que não continha células aderidas.

As células foram expostas às membranas por 48 e 72 horas. Após cada período, os discos foram retirados, o meio de cultura foi descartado e os poços foram lavados com PBS. Depois, foram adicionados em cada poço 400 µL de meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/mL). As placas foram incubadas por 4 horas e então o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro de placas ELISA a 570 nm. A viabilidade celular foi calculada através da Equação 3, a qual se baseia na densidade óptica (D.O) do controle negativo (CN).

$$\% \text{ viabilidade} = \left(\frac{(570\text{nm}_{\text{amostra}} - 570\text{nm}_{\text{branco}})}{(570\text{nm}_{\text{CN}} - 570\text{nm}_{\text{branco}})} \right) * 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Etapa 2

3.4 Ensaio clínico

3.4.1 Tipo e local de estudo

Trata-se de um estudo clínico prospectivo, realizado nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) e Unidades da Saúde da Família (USF), vinculados ao Sistema Único de Saúde no município de Araraquara, interior do estado de São Paulo. Teve início mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP campus Araraquara-SP, sob o número CAAE: 83447618.7.0000.5426, com parecer de aprovação número: 2.807.853.

3.4.2 Participantes do estudo

Indivíduos adultos diabéticos, com idade entre 18 e 90 anos, de ambos os sexos, cadastrados no sistema único de saúde (SUS) e em sua respectiva área de atendimento, em acompanhamento por motivos relacionados a úlceras crônicas.

3.4.3 Critérios de Inclusão

Foram incluídos na pesquisa indivíduos de 18 a 90 anos de ambos os sexos, portadores de DM, portadores de úlceras dos tipos 1 e 2 na escala de Wagner (sendo grau 1 úlcera superficial, sem envolvimento de tecidos adjacentes, não clinicamente infectada e grau 2, úlcera profunda, com infecção, sem osteomielite) (WAGNER, 1981) e que são acompanhados pelos serviços públicos em virtude da existência de úlcera crônica.

3.4.4 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os casos de participantes não diabéticos com úlceras e participantes que apresentaram úlceras do tipo 3 ou maior na escala Wagner (úlceras profundas, com celulite, abscesso, osteomielite ou necrose) (WAGNER, 1981).

Além disso, outros critérios motivaram a exclusão do participante da pesquisa como desistência do participante; aplicação de outros produtos na úlcera, após o início do estudo que não sejam adotados no protocolo desta pesquisa; participante que apresentar alguma limitação, não sendo possível realizar o autocuidado e/ou sem condições de compreender e seguir as orientações e cuidados do protocolo da pesquisa; apresentar eventos ou reações adversas que indiquem a necessidade de suspender a intervenção proposta. Tais critérios foram utilizados no estudo de Silva (2019).

3.4.5 Amostra

A amostra selecionada para contemplar o estudo foi realizada por conveniência, no qual foram selecionadas algumas UBSs por número de participantes e proximidade entre elas, visando otimizar a logística em relação à locomoção da pesquisadora. Todos os participantes responderam o questionário, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e foram submetidos a exames físicos gerais (pressão arterial, peso, altura e glicemia capilar) para a coleta de dados essenciais à análise de resultados.

O estudo contou com 6 participantes, diabéticos acometidos por úlcera em pé diabético de etiologia arterial, sendo divididos aleatoriamente em dois grupos com três indivíduos cada.

3.4.6 Identificação dos grupos

- Grupo 1 (G1): Membrana de látex natural.
- Grupo 2 (G2): Membrana de látex natural com colágeno.

3.4.7 Confeção das membranas para ensaio clínico

As membranas foram confeccionadas pelo método de “casting” exatamente como descritas nos itens 3.1.1 e 3.1.2. Após polimerização completa do látex, as membranas foram recortadas com o intuito de se aproximarem do formato da úlcera de cada participante a exemplo do que foi feito no estudo de Silva (2015).

3.4.8 Registro e análise de imagem

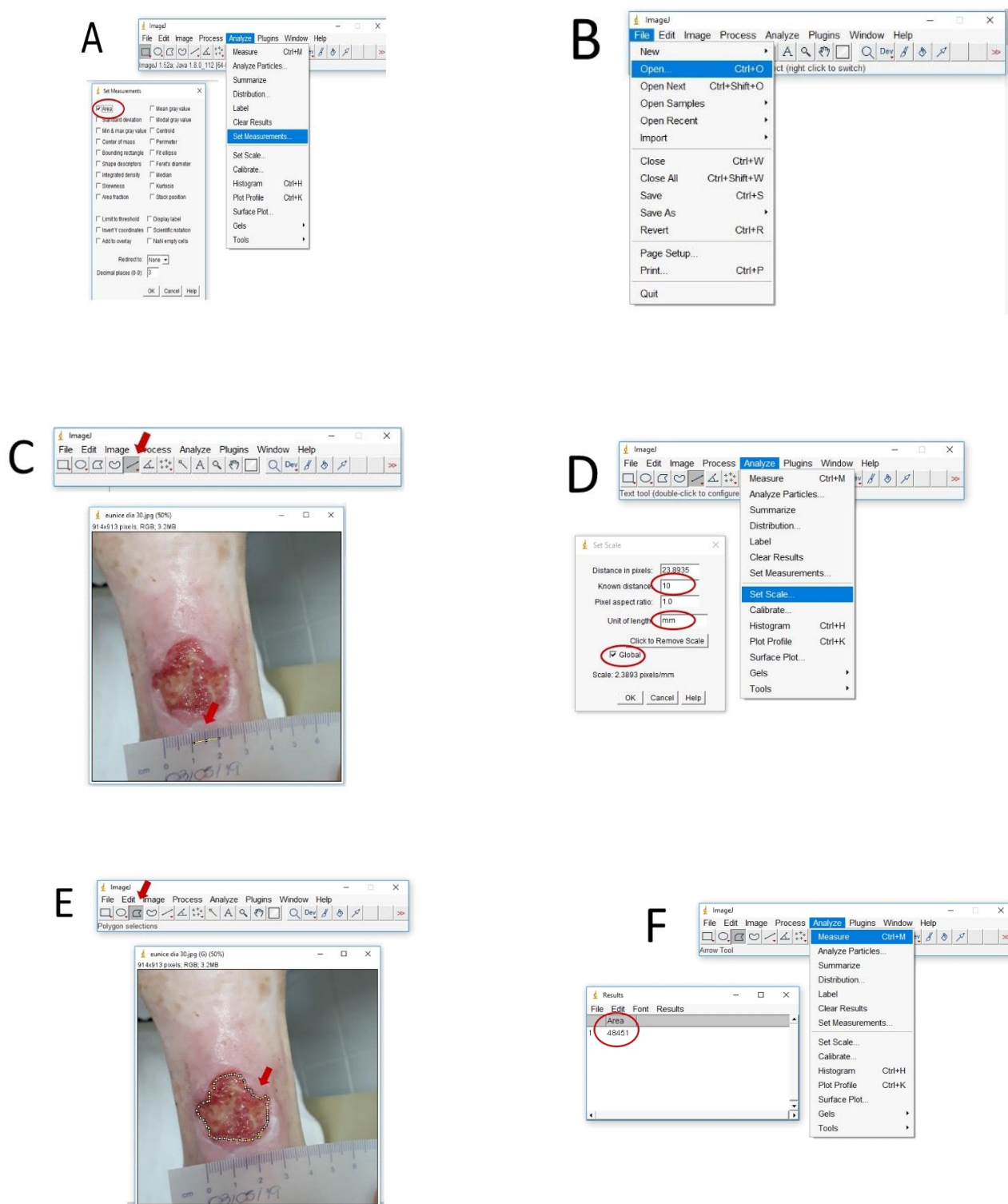
As imagens foram registradas dos dias: 1º, 30º, 60º e 90º, até o fechamento das feridas e/ou quando houve alteração visível da úlcera indicativa da necessidade de registro. As imagens das úlceras foram registradas utilizando máquina fotográfica da marca NIKON® Coolpix P520, no tamanho de 16 megapixels no modo “Auto”, sem *flash* e sem *zoom*. Padronizou-se uma distância de 20 cm entre a câmera e a úlcera, ângulos semelhantes e condições semelhantes de iluminação (luz natural). Além disso, foram utilizadas réguas de papel próximas ao leito da úlcera para se ter um parâmetro de medida.

As imagens foram transferidas para um computador e analisadas no Software ImageJ 1.52a, disponível gratuitamente na rede e desenvolvido por Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institutes of Health - NIH (Bethesda, Maryland, EUA) (LEITE, 2016).

Para calcular a área, o ImageJ, primeiramente foi necessário habilitar a função “Area” em <Set Measurements> do menu <Analyze> (Figura 13A). Para abrir a imagem foi pressionado <Open> no menu <File> (Figura 13B), foi realizada a calibração do software baseando-se em distância conhecida. Utilizando a ferramenta “Straight”, foi traçado na régua o limite correspondente à 10 mm (Figura 13C). Em <Set scale> do menu <Analyze> apareceu o valor correspondente ao traço feito na régua. Na caixa “Know distance” foi digitado o número “10” e na caixa “Unit of length” digitado “mm”. A caixa “Global” deve sempre ficar habilitada. Para cada imagem foi feita a calibração do software (Figura 13D). Utilizando a ferramenta “Polygon selections” foi traçado o contorno da escoriação (Figura 13E). Por último, pressionando em <Measure> do menu

<Analyze> obteve-se o valor da área traçada em mm² (Figura 13F) (LEITE, 2016).

Figura 13: Esquema de cálculo de área das úlceras (mm²) utilizando o software ImageJ



Fonte: Autoria própria.

3.4.9 Cuidados com a segurança dos produtos

As membranas de látex natural foram embaladas e esterilizadas com óxido de etileno na OXETIL, empresa situada à Rua Lolita Sanchez Pretel, s/nº - Distrito Industrial CEP: 19360000 - Santo Anastácio - SP a fim de garantir a segurança do tratamento.

O óxido de etileno promove uma alquilação protéica a nível de RNA e DNA, ou seja, substitui o H dos grupos funcionais OH· e SH pelos radicais Etil e Metil, inibindo produção de proteínas, bem como seu metabolismo, causando a morte do microrganismo (GALVÃO, 2017).

Esse agente químico é indicado para borrachas sensíveis e possui compatibilidade com polímeros, portanto foi o agente esterilizante escolhido para garantir a segurança do produto (GALVÃO, 2017).

3.4.10 Aplicação da técnica de curativo

Os curativos foram realizados em salas específicas, dentro das Unidades Básicas de Saúde (UBS) ou Unidades da Saúde da Família (USF). Todos os funcionários das equipes de enfermagem que participaram da pesquisa foram previamente treinados pela pesquisadora juntamente com a enfermeira que faz parte do grupo de pesquisa. O treinamento consistiu em mostrar para a equipe como a técnica de curativo deveria ser realizada, com o intuito de padronizá-la. Dessa maneira, todas as Unidades participantes trabalharam da mesma forma. A demonstração da técnica foi realizada com o auxílio de simuladores gentilmente cedidos pelas enfermeiras do grupo de pesquisa.

O curativo foi realizado da seguinte forma: remoção das ataduras do curativo anterior, limpeza da ferida com soro fisiológico em temperatura ambiente, usando gaze de algodão estéril montada numa pinça ou com uso de luvas estéreis, dependendo do tipo de tecido presente no leito da ferida e das condições do local. Em caso de presença de tecido necrosado em forma de esfacelo foi realizado desbridamento mecânico e nova limpeza.

A membrana foi recortada com auxílio de luvas estéreis e tesouras estéreis para adequar o tamanho de modo que não ultrapassasse as bordas da úlcera, evitando possíveis macerações teciduais e posteriormente colocada

sobre o leito da úlcera, tocando toda sua extensão, sendo protegida por cobertura secundária de gaze estéril em quantidade necessária em cada caso e fixação por atadura crepe e fita adesiva. O curativo foi realizado em dias alternados (segunda, quarta e sexta-feira), baseado no trabalho de Silva (2017) na unidade de atendimento, pelos enfermeiros e técnicos de enfermagem atuantes nas unidades e que já realizam curativos dos participantes selecionados, com o auxílio da pesquisadora, que também realizou a coleta de dados relevantes para a pesquisa.

3.4.11 Procedimento

O projeto para o desenvolvimento desta pesquisa foi registrado na Plataforma Brasil por meio do endereço eletrônico: <<http://plataformabrasil.saude.gov.br/login.jsf>> que encaminhou para o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP, com Data da Relatoria: 08/08/2018 que gerou o número da CAAE: 83447618.7.0000.5426, com Parecer número: 2.807.853 (ANEXO A). Com a autorização do Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos, iniciamos a pesquisa.

Como instrumentos de pesquisa, foram utilizados um questionário estruturado (ANEXO B), aplicado como parte do protocolo, que incluiu entrevista e exame físico visando à coleta de dados essenciais para determinação do perfil geral do participante e de dados que possam gerar possíveis interferências no processo cicatricial.

Além da realização do curativo, propriamente dito e do registro de imagens da úlcera, constaram dessa avaliação inicial alguns dados, tais como identificação, perfil sociocultural e econômico, hábitos de vida, histórico de doença familiar, histórico da úlcera (quando e como surgiu), exame físico geral e da úlcera, com ênfase nos sinais e sintomas locais, verificação de glicemia capilar, pressão arterial, peso, altura e realização do cálculo de Índice de Massa Corpórea (IMC). Estes instrumentos foram aplicados e desenvolvidos de forma a contemplar a temática e possibilitar uma análise fidedigna dos dados.

O questionário foi aplicado no primeiro dia de curativo, assim como o registro dos dados do exame físico. Enquanto o questionário estava sendo

aplicado, um recorte de membrana era acomodado no antebraço do participante para testar possíveis reações alérgicas ao produto. Ao longo do tempo, os participantes foram reavaliados para atualizar dados que demonstraram evolução do tratamento, seja em dimensões ou mudanças teciduais. Tais dados foram cuidadosamente registrados, para uma melhor visualização da evolução do quadro e do processo de cicatrização dos participantes da pesquisa.

Todos os voluntários foram esclarecidos sobre os objetivos e procedimentos do estudo, sendo garantida sua participação anônima e na condição de voluntário. Aqueles que aceitaram participar, assinaram o TCLE, atendendo à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (ANEXO C).

A aplicação do questionário, coleta de amostras, realização dos curativos e registro de imagem foram realizadas individualmente com cada participante em período estipulado conforme o desenvolvimento da pesquisa, em horário de funcionamento das Unidades de Saúde (das 7:30 às 17:00), de modo que facilitou a adesão dos indivíduos à pesquisa e não interferiu na rotina local.

A pesquisa foi realizada mediante a colaboração da pesquisadora juntamente com as instituições envolvidas e consentimento do participante e Instituições Municipais de Saúde.

3.4.12 Cálculo do Índice de Cicatrização da Úlcera (ICU)

O cálculo da ICU foi feito seguindo a seguinte fórmula (Equação 4).

$$\% = \frac{Ai - Af}{Ai} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

"Ai": corresponde a área inicial da úlcera

"Af": corresponde a área final da úlcera.

3.5 Análise estatística

Todos os resultados foram demonstrados com medidas de média e desvio padrão. Os resultados do ensaio de ângulo de contato, resistência mecânica, e MTT foram tabulados no software BioEstat 5.3, o qual foi utilizado para realizar

as análises estatísticas. Primeiramente, foi realizado testes de normalidade para verificar os resultados são paramétricos ou não paramétricos, posteriormente foi utilizado o teste de ANOVA *one-way* com teste de *post-hoc* de Bonferroni, para avaliar se houve diferença significativa entre os dados encontrados nas amostras. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (95% de confiança).

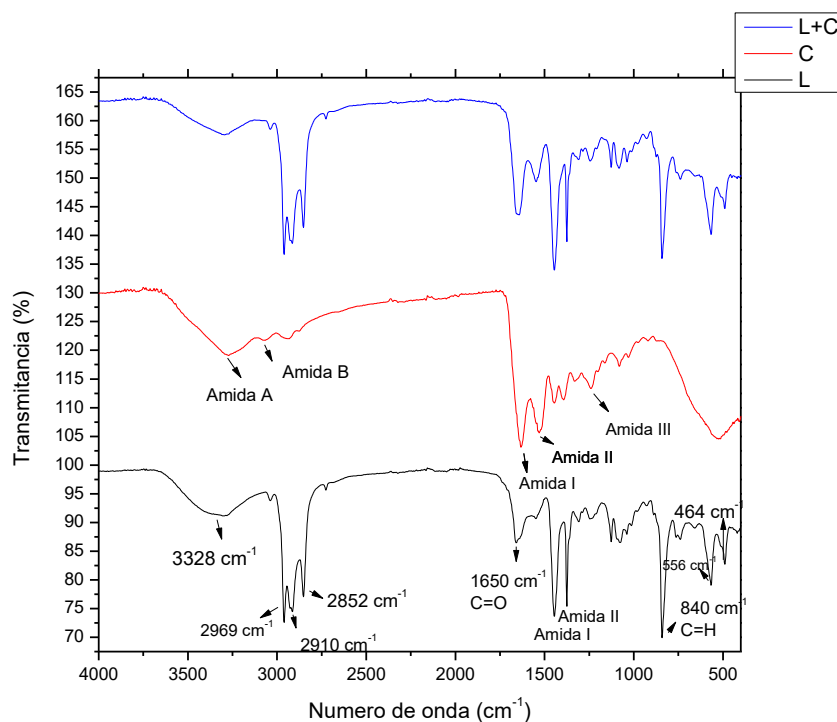
4. Resultados e discussão

4.1 Caracterização físico-química das membranas

4.1.1 Espectroscopia por infravermelho (FTIR)

Com a finalidade de identificar grupos funcionais característicos de cada material utilizado no trabalho e também, de diferenciá-los, foram utilizados espectros de FTIR (Figura 14) de amostras da membrana de látex natural com colágeno, colágeno hidrolisado e membrana de látex natural puro. Esta técnica permite identificar as estruturas químicas funcionais características de cada material (VALAND *et al*, 2019) e permite avaliar se houve interação química entre dois compostos (JOHNSON, 2020).

Figura 14: Espectros FTIR da membrana de látex natural + colágeno, colágeno hidrolisado e látex natural.



Fonte: Autoria própria.

O espectro sinalizado em vermelho, mostra o padrão encontrado para colágeno hidrolisado. As principais bandas vibracionais encontradas no

colágeno foram Amida A (3300 cm^{-1}), Amida B (3074 cm^{-1}), relacionadas principalmente às vibrações de alongamento dos grupos N-H (Yang *et al*, 2017). Em seguida, aparecem os picos de Amida I, II e II, que correspondem a ligações peptídicas. A banda de 1628 cm^{-1} (Amida I) corresponde a vibrações de alongamento C=O, a banda de 1527 cm^{-1} (Amida II) é caracterizado pelas ligações de C-N e N-H e por fim, o pico de 1235 cm^{-1} (Amida III) é atribuído pelo alongamento C – N e N – H vibrações de flexão e vibrações de grupos CH_2 na cadeia principal da glicina. Os achados corroboram com estudos anteriores, como Riaz *et al* (2018), Indrani *et al* (2017) e Yang *et al* (2017).

O espectro de coloração preta corresponde à membrana de látex natural. Foram encontradas bandas de absorção características para o poli(*cis*-1,4-isopreno), a borracha: 2914 cm^{-1} alongamento C–H de CH_2 , 2851 cm^{-1} alongamento C–H de CH_2 e CH_3 , 2848 cm^{-1} estiramento simétrico de CH_2 , 1653 cm^{-1} alongamento de C=C, 1452 cm^{-1} flexão de CH_2 , 1446 cm^{-1} , 840 cm^{-1} deformação angular de C=CH (GEMEINDER *ET AL*, 2016, LYE *ET AL*, 2019 E AGOSTINI 2009). Além disso, existem bandas de absorção que caracterizam as partes proteicas e lipídicas do látex natural: 1650 cm^{-1} banda carboxila C=O, 1446 cm^{-1} Amida I e 1375 cm^{-1} Amida II (JARNTHONG *ET AL*, 2017).

No espectro representado em azul na Figura 14, é possível analisar que a incorporação do colágeno na membrana de látex natural não modificou a estrutura da matriz polimérica, incorporando os grupos químicos característicos do colágeno e sobrepondo (caracterizando um alongamento) os grupos comuns aos dois materiais (Amida I e Amida II), não demonstrando interações entre grupamentos químicos, mantendo a funcionalidade tanto do látex como do colágeno. Diante desses resultados, pode-se concluir que a adição de colágeno ao látex natural não causou modificações estruturais e funcionais no compósito criado.

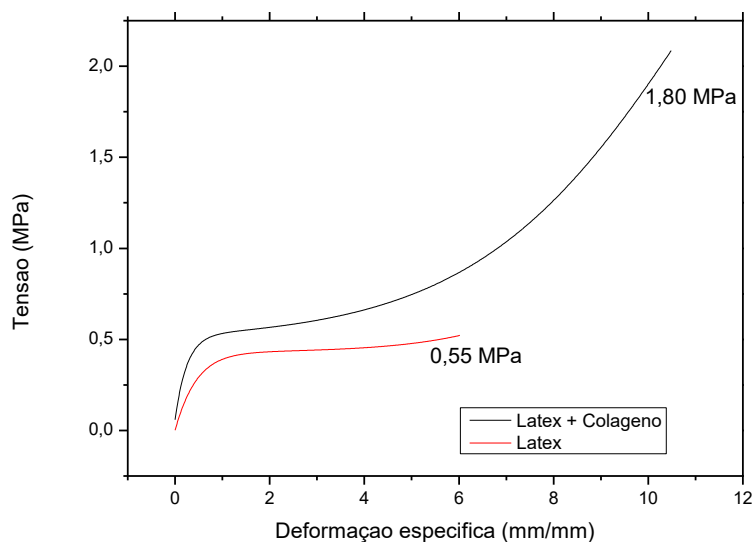
4.1.2 Ensaio Mecânico

A membrana de látex puro apresentou um alongamento de 553% (5,53 mm/mm) em relação ao seu tamanho inicial, já a membrana de látex com colágeno, aumentou seu tamanho em 964% (9,64 mm/mm). Em relação a tensão de ruptura, a membrana de látex com colágeno apresentou uma tensão maior,

de 1,80 MPa enquanto a membrana de látex puro, teve a tensão de ruptura de 0,55 MPa. O módulo de Young, que mede o módulo de elasticidade do material, foi de 3 MPa para a membrana de látex com colágeno, contra 0,81 MPa apresentado pela membrana de látex puro. A Figura 15 mostra o gráfico comparativo de tensão (MPa) x deformação (mm/mm) das membranas e a Tabela 1 resume os dados mencionados no texto.

Os resultados obtidos mostram que a membrana de látex com colágeno precisou de uma força 411% maior para esticar até o rompimento, portanto é mais rígida comparada à membrana de látex puro. Entretanto, devido ao maior alongamento, a adição de colágeno à membrana de látex natural, tornou-a mais elástica. Esses dados mostram que para ser utilizada curativo, essa membrana se adapta com mais facilidade ao leito da ferida.

Figura 15: Curva de tensão e deformação da Membrana de Látex e Membrana de Látex + Colágeno.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 1: Valores mensurados no ensaio de resistência à tração para as amostras látex puro e látex com colágeno.

Membrana	Alongamento (mm/mm)	Tensão de Ruptura (MPa)	Módulo de Young (MPa)
Látex Puro	5,53 (DP:±2,69)*	0,55 (DP:±0,27)	0,81 (DP:±0,14)*
Látex com colágeno	9,64 (DP:±0,74)*	1,80 (DP:±0,26)	3,00 (DP:±0,75)*

ANOVA *one-way* com teste de *post-hoc* de Bonferroni. O asterisco (*) mostra que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as duas membranas analisadas.

Fonte: Autoria própria.

Floriano *et al* (2017) incorporaram cetropreno na membrana de látex natural. Este estudo encontrou um módulo de Young de 0,64 MPa e uma resistência à tração de 0,85 MPa, dados que corroboram com os resultados deste trabalho. Os autores também demonstraram que a adição do fármaco reduziu em 1,25 o alongamento na ruptura, tornando a membrana mais rígida e quebradiça, com menor deformação plástica (FLORIANO *et al*, 2017).

Outro estudo utilizou a membrana de látex natural incorporada com três tipos diferentes de própolis. Foram encontrados módulos de Young de 0,68, 0,59, 0,90 e 0,95 MPa para membrana de látex natural, membrana de látex natural+própolis verde, membrana de látex natural+própolis vermelho e membrana de látex natural+própolis álamo, respectivamente. Quanto ao alongamento, a membrana de látex natural+própolis verde se mostrou mais rígida (908%) quando comparado à membrana de látex natural pura (939%), enquanto as membranas da própolis vermelha NRL e da própolis NRL-álamo apresentaram aumento de 957 e 1135%, respectivamente, se mostrando mais elásticas. Esses achados mostram que ao adicionar compostos na membrana de látex natural, sua flexibilidade pode ser diminuída ou aumentada, mas o módulo de Young não se distancia daquele próximo ao da pele (ZANCANELA *et al*, 2019)

Um bom curativo, além de possuir os benefícios da cicatrização, também deve apresentar propriedades mecânicas razoáveis e semelhante à pele humana, para que se adapte bem ao leito da ferida. Deve ser flexível, elástico, de boa aderência na pele, fácil de aplicar, que não haja danos ao remover e confortável ao indivíduo (KHAN, 2000).

No trabalho em questão os curativos foram aplicados em indivíduos diabéticos em sua maioria, idosos. O diabetes, influencia no comportamento da pele ao longo dos anos. A pele do diabético tende a ficar mais rígida de acordo com a idade e com o agravamento da doença, pois há maior perda de colágeno, acelerando o envelhecimento da pele (ARGYROPOULOS *et al*, 2016).

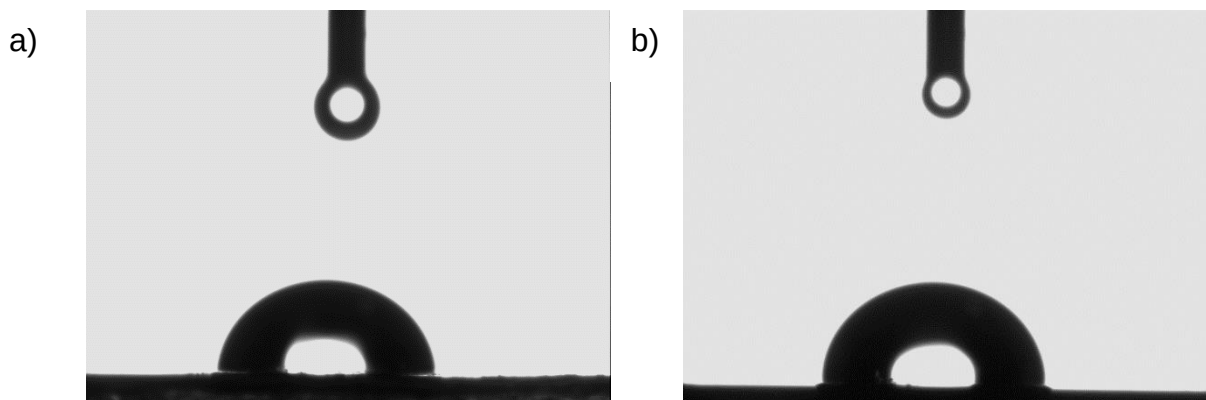
A deformação até ruptura da pele do idoso é de 60% (PAWLACZY, LELONKIEWICZ, WIECZOROWSKI, 2013) o que mostra que ambos os curativos utilizados no estudo possuem potencial para ser usado como curativo, pois apresentam deformação maior que a da pele.

O módulo de elasticidade da pele é um valor que aumenta linearmente ao longo do tempo, variando de 2,5 a 16 MPa, pois pele madura é mais fina, menos elástica, mais tensa e mais rígida (PAWLACZY, LELONKIEWICZ, WIECZOROWSKI, 2013). Sendo assim, um material que apresentar módulo de elasticidade semelhante ao da pele, como a membrana de látex com colágeno, se adaptará melhor ao leito da ferida, e às curvaturas naturais do local em que será colocada. Além disso, as membranas não são adesivas, portanto, não causam danos se removidas adequadamente, caracterizando uma cobertura promissora.

4.1.3 Ângulo de contato

As medidas de ângulo de contato foram realizadas após 30 segundos de contato da gota com a membrana (MIRANDA, 2018). Os resultados obtidos da membrana de látex variaram de 83,10 a 90,50° com uma média de 86,60° e desvio padrão de 2,44°. No entanto as medidas encontradas nas membranas de látex natural incorporada com colágeno foram de 88,50 a 96,00°, com média de 93,27° e desvio padrão de 1,84°, sendo maior quando comparado com a membrana de látex natural. Sendo assim, a membrana de látex natural com colágeno é mais hidrofóbica. A Figura 16 ilustra a gota sobre as duas membranas.

Figura 16: Fotografias da análise de ângulo de contato para as membranas de (a) látex natural e (b) látex natural com colágeno.



Fonte: Autoria própria.

Os valores encontrados para a membrana de látex natural estão de acordo com aqueles encontrados na literatura (BARROS *et al*, 2019; MORISE *et al*, 2019 e MIRANDA, 2018). Este material apresenta hidrofobicidade intermediária ($45^\circ < \alpha < 90^\circ$).

A adição de compostos na membrana de látex interfere diretamente no ângulo de contato, Barros *et al* (2019) incorporou glicerol na membrana de látex natural e os resultados revelaram uma membrana altamente hidrofílica, sendo impossível calcular o ângulo de contato.

A membrana de látex com colágeno apresentou média angular maior que 90° , o que caracteriza este material como hidrofóbico. Essa condição ocorreu devido a adição do colágeno hidrolisado, pois essa proteína apresenta na sua composição, uma grande variedade de aminoácidos de caráter hidrofóbico.

Na estrutura da proteína, esses aminoácidos se encontram tanto no interior quando na superfície da molécula, sendo insolúvel em água. Porém, o colágeno hidrolisado apresenta certa solubilidade em água, pois há a quebra de ligações covalentes, desorganizando sua estrutura (SILVA e PENNA, 2012). Outro estudo mostrou que a desnaturação da tripla hélice de colágeno promoveu maior absorção de água, quando comparado com as fibras de colágeno (SHI *et al*, 2019).

Devido a esse fato, a utilização do colágeno puro para fins curativos não é interessante, sendo comum a adição do colágeno hidrolisado em diversos

compostos para se beneficiar das propriedades cicatrizantes do colágeno e ainda solucionar os problemas gerados pelas características físico-químicas do material (GE *et al*, 2018).

No que diz respeito à aplicação clínica da membrana de látex natural com colágeno, a hidrofobicidade provoca menor interação entre o leito da ferida e a cobertura. Todavia, a aplicação do colágeno hidrolisado na regeneração tecidual torna-se interessante devido à alta concentração de glicina e prolina, aminoácidos essenciais para estabilidade da matriz extracelular e regeneração de cartilagens e tecidos (SILVA e PENNA, 2012).

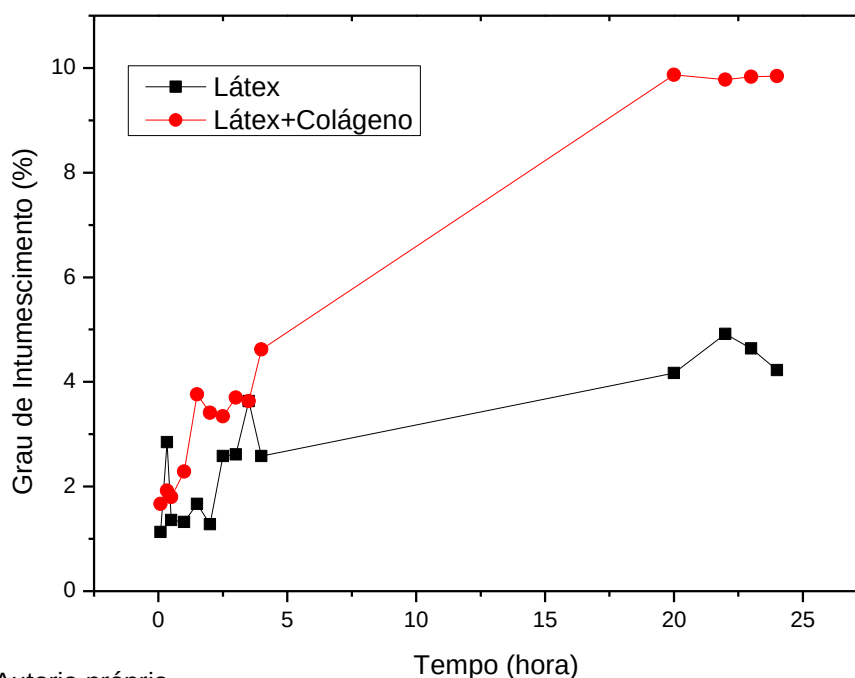
Um estudo avaliou o ângulo de contato de membranas feitas à base de quitosana e comparou com uma outra feita apenas de quitosana e colágeno. O autor chegou à conclusão de que a adição do colágeno aumentou o ângulo de contato da membrana. No entanto, o autor relatou que todas as membranas mantiveram o caráter hidrofílico, uma vez que a quitosana já é um material altamente hidrofílico (SOUZA, 2018).

4.1.4 Intumescimento

A análise do intumescimento avalia a capacidade de absorção de água apresentada pelo material quando colocadas em um meio aquoso. Este parâmetro é importante para avaliar se a membrana será capaz de absorver o exsudato das feridas.

Os resultados mostraram que a membrana de látex natural é capaz de absorver 4,2% de água em 24 horas (Figura 17). O látex natural apresenta majoritariamente na sua composição, poli(cis-1,4-isopreno), fosfolipídios e proteínas, que causam dificultam a absorção de água por promover reticulação entre cadeias poliméricas (BARROS, 2020). Cesar *et al* (2020) avaliou o GI de membranas de látex natural em 50 horas. Os autores demonstraram que a membrana é capaz de absorver 18% de água no período testado. Outro estudo detectou que a membrana de látex natural é capaz de absorver 6,1% da sua massa em água em um período de 24 horas (BARROS, 2020).

Figura 17: Cinética de intumescimento:



Fonte: Autoria própria.

A membrana de látex com colágeno absorveu 9,8% no período de 24 horas (Figura 17), sendo capaz de absorver maior quantidade de água, quando comparada com a membrana de látex natural. Barros (2020) realizou a avaliação do intumescimento em membranas de látex com colágeno 10% em solução de PBS a 37°C e detectou um GI de 4,4% em 24 horas.

Na literatura, é possível observar que a maior parte dos estudos contendo colágeno como curativo, utiliza-se de hidrogel de colágeno reticulado ou descelularizado (BARROS, 2020), o que não se aplica neste estudo. Entretanto, é relatado que o colágeno é um polímero capaz de absorver grande quantidade de água. Um estudo observou que o colágeno derivado da pele do peixe tem capacidade de absorver 425,3% de água e à medida que um compósito era criado a partir de adição de β -glucano, o GI diminuía, atingindo 232% de absorção com o material composto por 50% de colágeno e 50% de β -glucano (MICHALSKA-SIONKOWSKA *et al*, 2021).

Hamzah *et al* (2020) desenvolveram um produto a base de ácido polilático (PLA) imerso em soluções com diferentes concentrações de colágeno adquirido comercialmente para substituição de tecido ósseo. O produto com maior

concentração de colágeno alcançou 50% de intumescimento em 48 horas, enquanto o material com PLA puro, absorveu 20% do seu peso inicial no mesmo período.

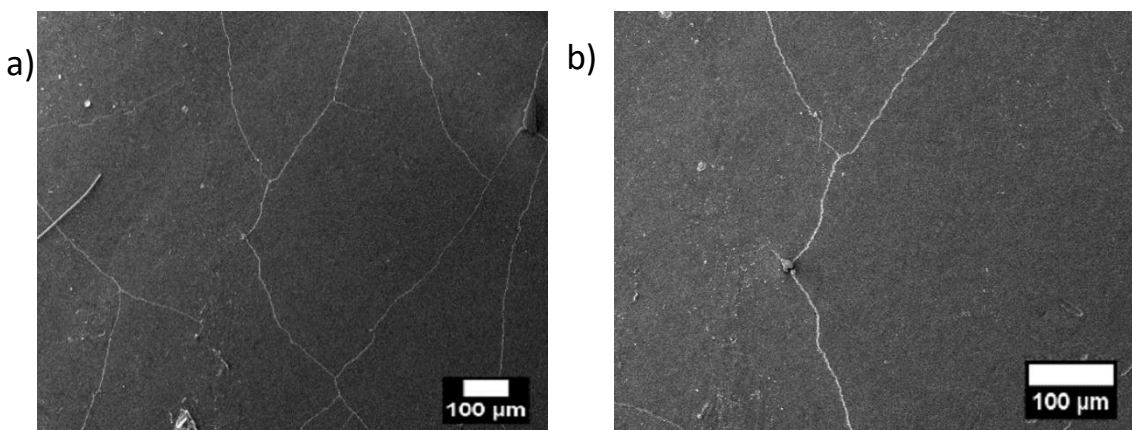
Além disso, alguns materiais são porosos, o que aumenta a absorção de água pelo material. Um estudo desenvolveu uma matriz porosa de colágeno derivado de tendão bovino para reparação dérmica. O ensaio de intumescimento mostrou que o material é capaz de absorver 5000% de água em 20 minutos (MASSIMINO *et al*, 2020).

Sendo assim, a adição de colágeno na membrana de látex natural promoveu um aumento na absorção de água, o que caracteriza uma vantagem na aplicação em feridas, pois conseguem absorver maior quantidade de exsudato quando comparado com a membrana de látex natural.

4.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O MEV é uma técnica versátil que permite visualizar a morfologia do material a nível microscópico (GARMS *et al*, 2019) bem como a distribuição do composto adicionado no material e suas possíveis modificações (GEMEINDER, 2020). A Figura 18 mostra a membrana de látex natural em aumento de 50x e 100x. É possível observar que é uma membrana lisa, sem poros e ausente de formações cristalinas. Esse achado corrobora com Silva *et al* (2020), Barros *et al* (2019) e Miranda (2018).

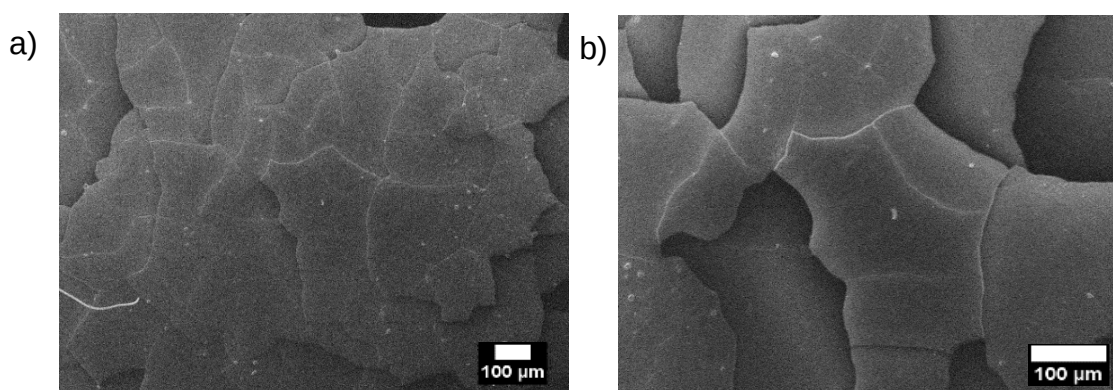
Figura 18: Micrografias da membrana de látex natural nos aumentos de (a) 50x e (b) 100x



Fonte: Autoria própria.

Entretanto na Figura 19, está evidenciado a membrana de látex natural com colágeno com ampliações de 50 e 100x. Nesta imagem é possível observar que houve modificação na superfície da membrana, com o aparecimento de estruturas cristalinas mostrando a incorporação do colágeno. Estes resultados corroboram com o trabalho de Barros (2019) que também incorporou colágeno em três diferentes concentrações (5, 10 e 15%) na membrana de látex. Em seu estudo, o autor evidenciou que a presença do colágeno hidrolisado no interior na membrana a partir de imagens de corte transversal ressaltou que o composto fornece peptídeos e aminoácidos, favorecendo a síntese de novas moléculas de colágeno necessárias na cicatrização de feridas.

Figura 19: Micrografias da membrana de látex natural com colágeno nos aumentos de (a) 50x e (b) 100x



Fonte: Autoria própria.

Outros materiais foram incorporados na membrana de látex natural, como escopolamina (MORISE et al, 2020), glicerol (BARROS et al, 2019), moxifloxacino (GARMS et al, 2019), cetoprofeno (FLORIANO et al, 2017), entre outros. Em todos os trabalhos, é possível observar a presença de cristais evidenciando que houve a incorporação de um composto na membrana de látex natural, uma vez que o látex natural possui superfície lisa e com a adição de compostos, a superfície apresenta relevos indicando a mistura. Além disso, em alguns casos, onde a mistura foi feita por absorção, no corte transversal é possível notar a presença do composto adicionado na membrana pela visualização dos cristais.

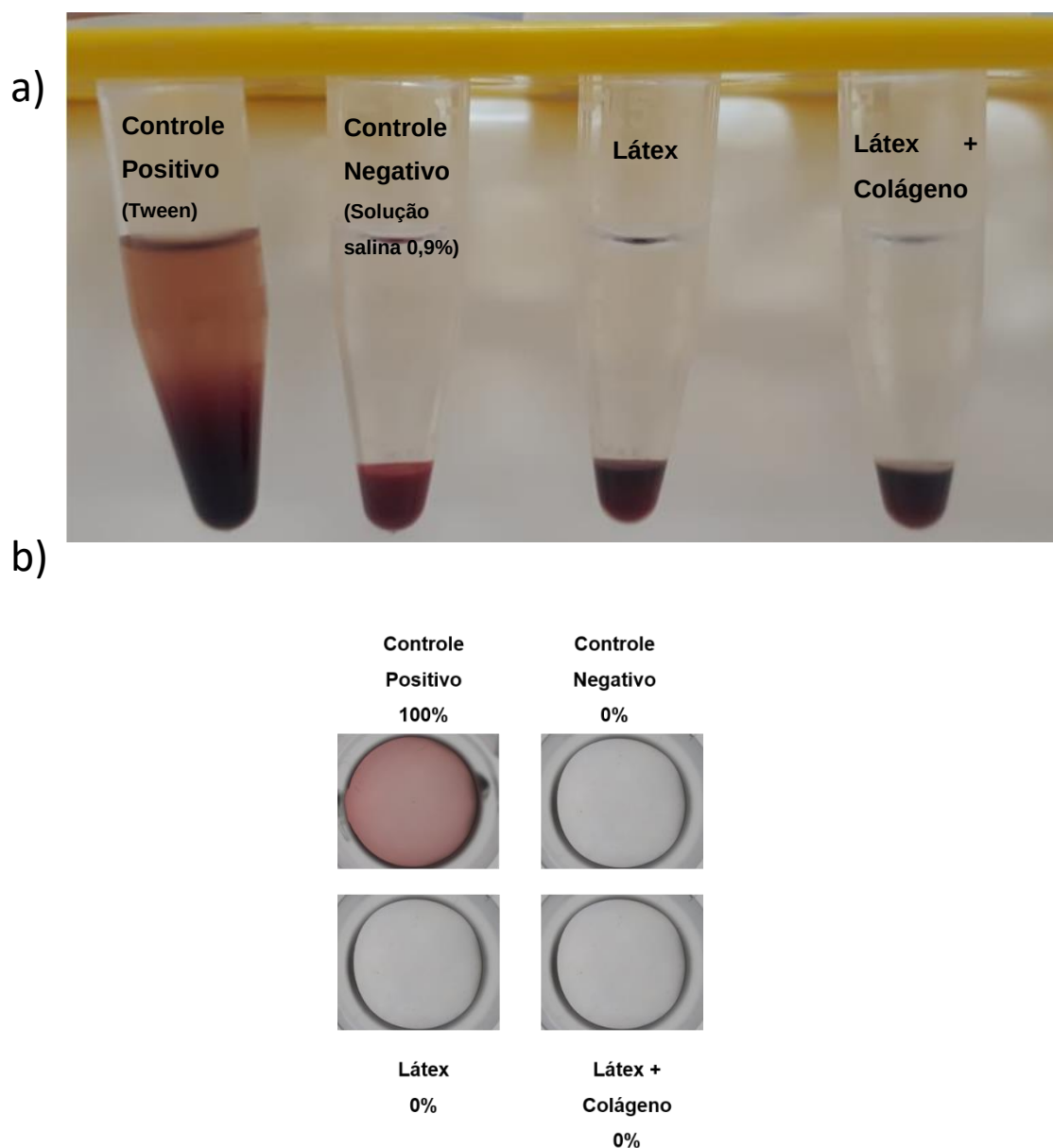
4.2 Ensaios de toxicidade in vitro

4.2.1 Hemólise

O ensaio de hemólise avaliou se os compostos liberados por ambas as membranas são capazes de lisar as hemácias de carneiro (MIRANDA, 2018).

Neste estudo, o experimento foi realizado por contato direto, ou seja, as membranas de látex natural e membrana de látex com colágeno foram incubadas com uma solução de eritrócitos a 5% (v/v) por 24 horas. Após esse período, as membranas foram retiradas e foi realizada a leitura do sobrenadante em absorbância de 540 nm. O Tween foi utilizado como controle positivo (aquele que causa lise das hemácias) e solução salina 0,9% foi utilizado como controle negativo. Os resultados evidenciaram 0 % de taxa de hemólise em ambas as membranas avaliadas (Figuras 20 a) e b)). Um material é considerado hemolítico quando apresenta taxas de hemólise superiores a 5% (HENKELMAN *et al*, 2009).

Figura 20: Resultado da hemólise em a) após 24 horas de incubação, onde o primeiro microtubo é o controle positivo (evidenciando a hemólise) e os restantes são controle negativo, Látex e Látex + Colágeno, respectivamente. Em b) imagem ampliada dos poços contendo o sobrenadante retirado dos microtubos para leitura da absorbância.



Fonte: Autoria própria.

Os achados corroboram com estudos previamente realizados nos quais membranas de látex natural foram utilizadas como matriz polimérica para aplicações biomédicas, como Barros *et al* (2019) que avaliou membranas de látex incorporadas com glicerol e também Miranda (2018) que avaliou membranas de látex incorporada com diferentes compostos, como hidroxiapatita (HA), pirofosfato de cálcio (CPP) e alfa tricálcico (α -TCP) para regeneração óssea. Os dois trabalhos citados evidenciaram que tanto a membrana de látex

quanto as membranas com compostos incorporados, apresentaram taxa de hemólise menor que 5%, sendo bons candidatos para futuras aplicações.

Na literatura é possível encontrar outros trabalhos a que utilizaram colágeno para aplicações biomédicas e curativas. Estes estudos revelaram que o colágeno apresenta taxas de hemólise inferior a 5%, sendo um bom material para aplicações. Sun *et al* (2017) avaliou a taxa de hemólise da esponja de colágeno, encontrando o valor de 1,89%. Entretanto Dang *et al* (2017) criou um hidrogel a base de colágeno e quitosana e a taxa de hemólise desse novo material foi menor que 2% o que também comprova a hemocompatibilidade do material.

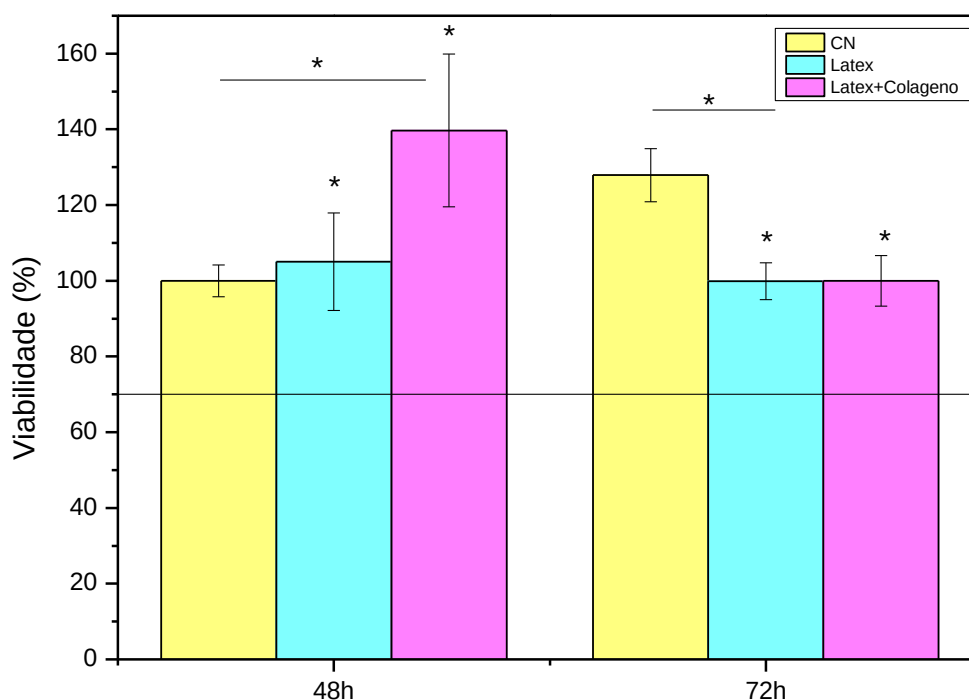
4.2.3 MTT

O ensaio de MTT foi escolhido para avaliar a biocompatibilidade dos materiais estudados. Este ensaio foi realizado via contato direto, nos quais discos de membranas de 6,0 mm de diâmetro foram depositados nos poços contendo fibroblastos (3T3) semeadas de maneira homogênea e meio de cultura. Foram utilizadas três placas de 24 poços que foram incubadas em tempos diferentes, sendo de 48 e 72 horas. Em cada placa foi realizado o teste de citotoxicidade (MTT). Segundo a norma da ISO 10993-5, o material é considerado biocompatível quando a viabilidade celular é maior que 70%.

Os resultados encontrados no período de 48 horas demonstraram que os materiais induziram aumento no metabolismo celular, indicando que houve certa multiplicação celular sendo de 139,39% para a membrana de látex com colágeno, 105,03% para a membrana de látex e 99,99% para o controle negativo. Estes resultados mostraram que em 48 horas, a membrana de látex com colágeno promoveu maior proliferação celular ($p < 0,05$) (Figura 21).

Após 72 horas, a porcentagem de viabilidade celular apresentou redução, mas ainda sim foi mantida a viabilidade, sendo de 99,99% para látex com colágeno e 99,91% para látex ($p < 0,05$) (Figura 21).

Figura 21: Gráfico da viabilidade celular (%) em relação ao tempo (horas)



ANOVA *one-way* com teste de *post-hoc* de Bonferroni. O asterisco (*) mostra que houve diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria.

Os resultados observados no tempo de 48 horas demonstraram excelente biocompatibilidade e bioatividade da membrana de látex com colágeno, demonstrando que os compostos liberados pelo material, estimulam a proliferação celular, sendo benéfica na aplicação para cicatrização de feridas.

Na literatura é possível encontrar diversos estudos que analisam a viabilidade celular de biomateriais a base de colágeno ou que contém colágeno na sua composição. Os testes são usualmente realizados em intervalos de tempo maiores do que os testados neste estudo, tendo duração de 1 até 14 dias (SADEGHI *et al*, 2016, SADEGHI-AVALSHAHR *et al*, 2017, SOBHANIAN *et al*, 2019 e MOUSAVI *et al*, 2019). Os trabalhos pesquisados demonstram um aumento na proliferação de células ao longo dos dias. Essa característica não

foi observada neste trabalho, provavelmente devido ao curto intervalo de tempo utilizado na avaliação.

Diversos estudos que avaliam o comportamento da membrana de látex natural, realizaram o teste de viabilidade celular por meio da reação do MTT. Os resultados encontrados nestes trabalhos confirmam a biocompatibilidade do material, porém nenhum outro estudo apresentou alta porcentagem como no presente trabalho. Morise *et al* (2019) demonstraram que a viabilidade celular apresentada pela membrana de látex foi de 92,30% em 24 horas e 135,37% em 72 horas. Zancanella *et al* (2019) encontrou valores de $92.56 \pm 6.52\%$ em 24 horas de incubação. Os trabalhos citados acima, realizaram o ensaio de MTT pelo método do contato indireto, ou seja, utilizaram o eluato formado pelos componentes liberados pela membrana ao invés de colocar a membrana diretamente nos poços contendo as células aderidas.

Apesar da divergência encontrada na literatura para ambas as membranas, os resultados se mostraram promissores, pelos quais as membranas demonstraram boa biocompatibilidade e bioatividade.

4.3 Ensaio Clínico

4.3.1 Classificação amostral

Os participantes foram submetidos a um questionário e as informações obtidas foram divididas em informações sociodemográficas, antecedentes familiares e estado de saúde do participante. As Tabelas 2, 3 e 4 a seguir, resumem esses dados.

Em relação ao gênero, 83,33% são homens, 50,00% têm entre 66 e 90 anos de idade e 50,00% são aposentados (Tabela 2). Esses dados são importantes, pois há estudos que demonstram que idade, gênero e nível de ensino, são fatores preditivos que aumentam as chances de um participante portador de DM desenvolver uma úlcera por pé diabético (MONTEIRO *et al.*, 2012, ZANOTI, 2017, MANTOVANI, 2016, YAZDANPANA, 2015, ZHANG, 2017 e COSTA, 2017).

Em relação à idade, sabe-se que a pele madura, é suscetível ao ressecamento, prurido, complicações vasculares e cutâneas. Indivíduos com

mais de 65 anos são propensos a apresentarem pelo menos um distúrbio de pele (FARAGE *et al.*, 2008, MONTEIRO-SOARES *et al.*, 2012). Vários estudos relataram que pessoas do gênero masculino possuem maiores riscos de serem acometidos pela úlcera do pé diabético, muito provavelmente devido à falta de autocuidado em relação a higiene (NEHRING *et al.*, 2015).

Quanto ao nível de escolaridade, 33,33% possuem ensino fundamental incompleto. Segundo a SBD, indivíduos sem instrução ou com ensino fundamental incompleto apresentam maior incidência de diabetes, sendo 9,6% do total desses indivíduos. O nível de escolaridade é importante para que o participante saiba buscar informações e compreender de maneira efetiva, as orientações passadas pelo profissional da saúde. Um baixo nível de conhecimento leva a limitação de informações, consequentemente dificultando o entendimento sobre nutrição, dosagem de medicamento e cuidados com a úlcera (ZANOTI, 2017).

Tabela 2: Informações Sociodemográfica acerca dos participantes.

	n=6	%
Sexo		
Feminino	1	16,66
Masculino	5	83,33
Idade		
18-42	0	0
42-66	3	50
66-90	3	50
Raça		
Branco	4	66,66
Pardo	1	16,66
Preto	1	16,66
Ocupação		
Aposentados	3	50
Dono de Bar	2	33,33
Eletricista	1	16,66
Escolaridade		
Fundamental Incompleto	2	33,33
Fundamental Completo	1	16,66
Médio Incompleto	1	16,66
Médio Completo	1	16,66
Superior Completo	1	16,66

Fonte: Autoria própria.

Em relação aos antecedentes familiares, dois dados se destacam: 50% dos participantes revelaram possuir familiares com diagnóstico de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e 83,33% dos participantes relataram haver familiares com diagnóstico de DM (Tabela 3).

Esses dados corroboram com a literatura que trazem a prevalência aumentada de alguma doença nos indivíduos que já apresentam histórico familiar da mesma (KATULANDA RANASINGHE E JAYAWARDENA, 2014). Katulanda Ranasinghe e Jayawardena (2014) mostraram que o histórico familiar de DM foi associado a prevalência de obesidade e HAS que correspondem à

síndrome metabólica (FURUKAWA *et al.*, 2017). Além disso, ressaltaram a importância de identificar os participantes que possuem esse tipo de histórico, uma vez que podem se beneficiar de tratamentos mais direcionados e específicos.

Tabela 3: Informações dos antecedentes familiares dos participantes.

	n=6	%
Doença Vascular		
Não	4	66,66
Sim	1	16,66
Não Soube Responder	1	16,66
HAS		
Não	3	50
Sim	3	50
Não Soube Responder	0	0
DM		
Não	1	16,66
Sim	5	83,33
Não Soube Responder	0	0
AVE		
Não	3	50
Sim	1	16,66
Não Soube Responder	2	33,33
IAM		
Não	4	66,66
Sim	2	33,33
Não Soube Responder	0	0
Doença Degenerativa		
Não	5	83,33
Sim	0	0
Não Soube Responder	1	16,66
Doença Geriátrica		
Não	4	66,66
Sim	1	16,66
Não Soube Responder	1	16,66

Fonte: Autoria própria.

Em relação às condições atuais de saúde, 50% têm diagnóstico de HAS, 50% dos participantes possuem algum tipo de dislipidemia, e 100% são sedentários (Tabela 4).

Essas doenças associadas comprometem a circulação sanguínea principalmente em membros inferiores, dificultando a cicatrização de úlceras causadas por neuropatia diabética (APELQVIST, LARSSON e AGARDH, 1992).

A neuropatia está diretamente ligada à falta de fluxo sanguíneo nos membros inferiores, levando à diminuição de nutrição tecidual. Esse fator, combinado com a perda de sensibilidade na região e a marcha errada, leva à ulceração dos membros inferiores, principalmente na região plantar (CAMPOS *et al.*, 2016; ARMSTRONG, BOULTON e BUS, 2017).

Tabela 4: Informações sobre a saúde dos participantes

	n=6	%
Pressão Arterial		
Normotenso	3	50
Hipertenso	3	50
Hipotenso	0	0
IMC		
Baixo peso (<18,5)	0	0
Peso adequado (≥ 18,5 e < 25)	4	66,66
Sobrepeso (≥ 25 e < 30)	2	33,33
Obesidade mórbida (≥ 30)	0	0
Diagnóstico de Dislipidemia		
Não	3	50
Sim	3	50
AVE		
Não	6	100
Sim	0	0
Doença Vascular		
Não	6	100
Sim	0	0
Amputação Anterior		
Não	5	83,33
Sim	1	16,66
Tipo de DM		
Tipo 1	3	50
Tipo 2	3	50
Sedentarismo		
Não	0	0
Sim	6	100

Fonte: Autoria própria.

4.3.2 Caracterização dos participantes do G1

Os participantes do G1 serão denominados como L (referente a látex) e os participantes do G2 serão denominados como LC (referente a látex+colágeno).

Participante L1

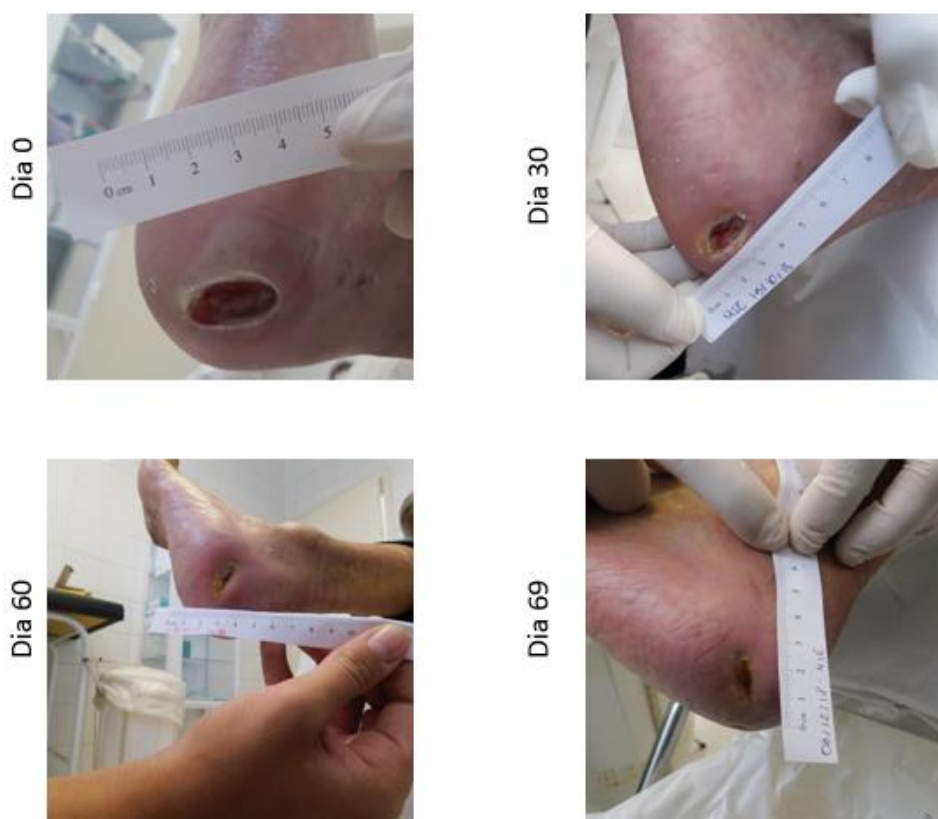
Homem, 67 anos, branco, possui ensino fundamental incompleto, trabalha como eletricista autônomo e mora com a mulher e um filho em uma casa própria.

É diabético há cerca de 20 anos e sedentário. O tempo de existência da úlcera é de 4 meses, está localizada no membro inferior esquerdo (MIE), na região do calcâneo. Antes de realizar o curativo com a membrana de látex, fazia curativo com uma pomada de hidrogel+alginato de cálcio. Na úlcera havia presença de tecido de granulação, sem exsudato significativo (Figura 22). O participante não apresentou hipersensibilidade ao produto.

Ao final de 69 dias, a úlcera reduziu em 100% de tamanho, completando sua cicatrização (Figura 22). Ao longo do tratamento, foi observado que as bordas da úlcera apresentavam uma vermelhidão.

Após 30 dias de cicatrização, o participante retornou na UBS apresentando uma hiperqueratose (calosidade) no local onde cicatrizou a úlcera. Diante dessa situação, foi realizado desbastamento da área onde foi removido o excesso de hiperqueratose. Esse procedimento não ocasionou nova úlcera. O participante teve mais conforto e foi orientado a fazer hidratação constante e continuar o acompanhamento na unidade para manutenção da hiperqueratose caso venha a se formar novamente.

Figura 22: Registro fotográfico do seguimento clínico do participante L1



Participante L2

Homem, 74 anos, dono de bar, sedentário e apresenta dificuldades para andar necessitando do auxílio de uma bengala. O participante tem diagnóstico de DM tipo 1, HAS, aparenta ter problemas com colesterol alto (não soube responder, mas relata que faz uso de Sinvastatina) e tem hipertireoidismo.

Realiza tratamento medicamentoso via oral com Puran T4, Glencamicida, Glifage, Losartana, Sinvastatina, Cilostazol. Possui duas úlceras no membro inferior direito (MID) na região maleolar, identificadas como L2 a úlcera localizada na parte interna e L2² a úlcera localizada na parte posterior (Figuras 23 e 24). O tempo de existência das úlceras é de 3 anos. Antes do tratamento com a membrana de látex natural, o participante fazia uso de espuma de prata e Safgel®. O participante não apresentou hipersensibilidade ao produto.

Nos primeiros 60 dias de tratamento, a úlcera L2 apresentou um aumento de 938,21% em relação a sua área inicial. Isso aconteceu devido à ausência de tecido subjacente, a impressão era de que a úlcera era pequena, enquanto na verdade, tinha dimensões maiores e apresentava tecido desvitalizado abaixo da pele. Além disso, ao longo do tratamento, a úlcera apresentou infecção bacteriana e drenava uma secreção amarelo-esverdeada. O diagnóstico foi realizado pela enfermeira e médico, ambos funcionários da UBS em que eram realizados os curativos. Sendo assim, com 60 dias de tratamento, o participante começou tratamento via oral com Cefalexina. Após esse tratamento, a úlcera começou a reduzir de tamanho. Em 125 dias de curativo, a úlcera apresentou a reepitelização completa.

Em relação a úlcera L2², a reepitelização completa se deu com 139 dias de curativo. Ao longo do tratamento, foi observado que as bordas de ambas as úlceras apresentavam uma vermelhidão além disso, o participante abandonou o uso da bengala, relatando maior conforto.

Figura 23: Registro fotográfico do seguimento clínico do participante L2



Fonte: Autoria própria.

Figura 24: Registro fotográfico do seguimento clínico do participante L2²



Fonte: Autoria própria.

Participante L3

Homem, 56 anos, branco, afastado do trabalho. Diagnóstico de DM tipo 1, HAS, dislipidemia (não faz uso de medicamento) e doença vascular. Teve o 2º dedo amputado. O tempo de existência das úlceras é de 1 ano, se localizam na região plantar do MID (Figura 25).

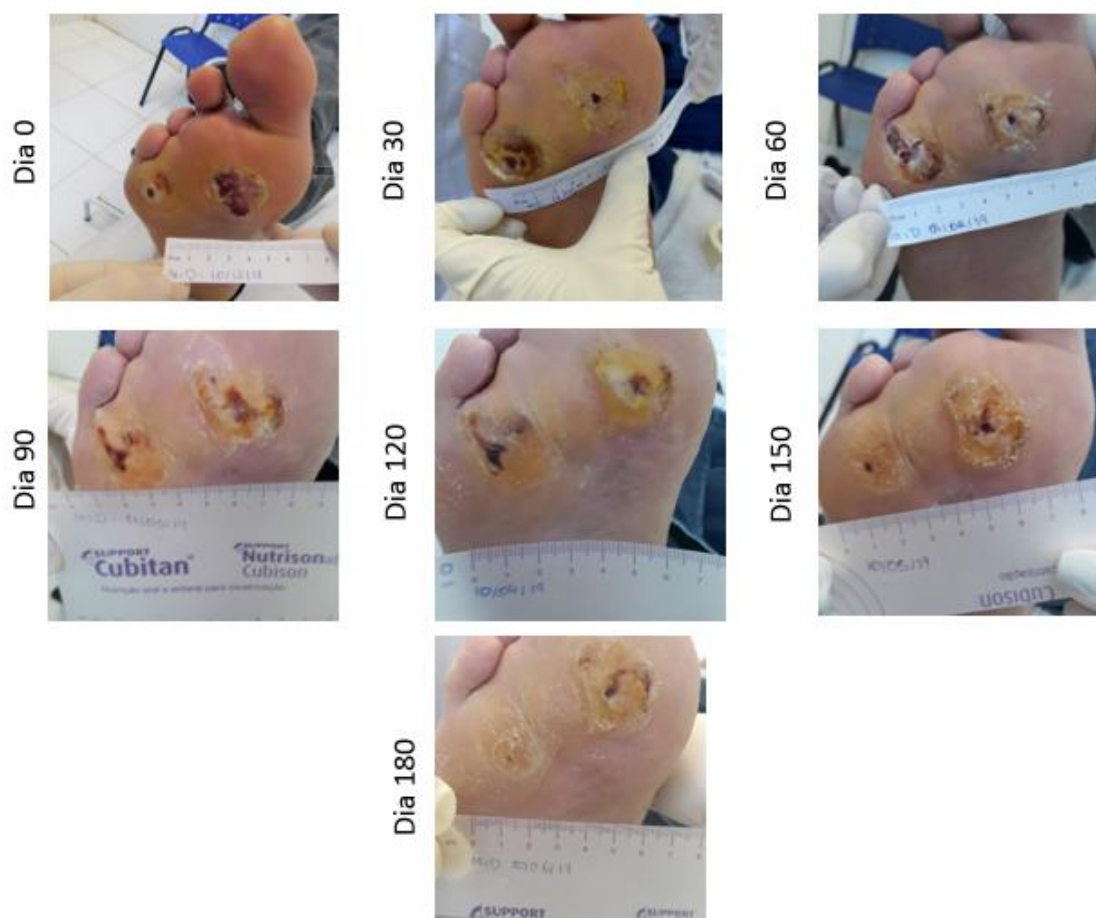
Ao longo do tratamento, começou a formar hiperqueratose ao redor da úlcera e por conta dessa condição, foi realizado o desbastamento da região com lâmina de bisturi, semanalmente pela enfermeira da UBS. O participante apresentava uma das úlceras com aspecto de “sangue pisado” onde por cima se formava a calosidade.

Com 34 dias de tratamento, o paciente comprou órtese própria para o portador de DM que ajudou no processo de cicatrização da sua úlcera e eliminou o aspecto de “sangue pisado”.

Com aproximadamente 57 dias de tratamento, o participante começou a relatar dor ao andar e as úlceras começaram a drenar exsudato seroso. Com 90 dias de tratamento, a úlcera localizada abaixo do 5º dedo (L3) foi 100% reepitelizada, formando uma calosidade no local e um pequeno hematoma que desapareceu ao longo dos dias. Para eliminação dessa calosidade, foi aplicado hidrogel em pasta, Duoderm®.

A úlcera localizada abaixo do hálux (L3²) apresentou uma redução de 97,28% com 120 dias de tratamento. A partir deste período, notou-se uma estagnação da redução do seu tamanho e com 180 dias de tratamento, em conjunto com a equipe e enfermagem do posto de saúde e o participante, optou-se por mudar o material de curativo, na tentativa de acelerar o processo de cicatrização e chegar em 100% de reepitelização. A não cicatrização dessa úlcera se dá pela marcha errada do participante, mesmo fazendo o uso do sapato próprio para o diabético.

Figura 25: Registro fotográfico do seguimento clínico do participante L3 e L3².



Fonte: Autoria própria.

A Tabela 5 resume a evolução dos participantes, indicando o tempo de ulceração, tempo de tratamento e ICU relativo aos dias 30, 60, 90 e 120.

É importante ressaltar que houve participantes que apresentaram um aumento no tamanho da ferida, negativando o valor do ICU. Esses valores estão representados em vermelho na Tabela 5.

Tabela 5: Índice de cicatrização das úlceras (ICU) dos participantes do grupo controle de acordo com o tempo de úlcera e porcentagem de cicatrização nos dias 30, 60, 90, 120 e ao final do tratamento.

Participante	Tempo de úlcera	Tempo de tratamento (dias)	ICU até 30 dias (%)	ICU 60 até dias (%)	ICU até 90 dias (%)	ICU 120 até dias (%)	ICU final (%)
L1	4 meses	69	28,68	85,85	100	100	100
L2	3 anos	125	-509,09	-938,21	-524,87	81,7	100
L2 ²	3 anos	139	-27,65	-70,53	100	-25,27	100
L3	1 ano	90	2,49	-740,84	100	100	100
L3 ²	1 ano	180	93,97	95,37	78,73	97,28	97

Fonte: Autoria própria.

O menor tempo de ulceração foi de 4 meses, enquanto que o maior tempo foi de 3 anos. O menor tempo de tratamento foi 69 dias, o maior tempo de tratamento foi de 180 dias. A menor porcentagem de ICU foi -938,21% e a maior porcentagem, foi de 100%. Os valores negativos referem-se a úlceras que aumentaram de tamanho durante o tratamento.

Dois participantes ultrapassaram a data limite do protocolo previsto para o projeto de pesquisa (90 dias) por razões diferentes. O participante L2 apresentou infecção bacteriana ao longo do tratamento e por isso, foi necessária a intervenção com antibióticos (no dia 60). A partir dessa data, foi possível observar que a úlcera começou a regredir de tamanho. O participante L3 teve uma úlcera cicatrizada em 90 dias e outra que seguiu tratamento até 180 dias, porém nos últimos 60 dias de tratamento, não foi observado evolução na regressão do tamanho da úlcera, e por isso, optou-se por trocar o tratamento.

Em relação ao participante L1, foi possível observar grande melhora em poucos dias por ser uma úlcera pequena e com pouco tempo de existência. Portanto pôde-se concluir que quanto menor a úlcera ou o tempo de existência, mais rápida foi a regressão do seu tamanho, ou seja, mais rápida foi a cicatrização.

4.3.3 Caracterização dos participantes do G2

Participante LC1

Homem, 66 anos, preto, aposentado e sedentário. Possui diagnóstico de HAS e DM tipo 1. Já sofreu infarto agudo do miocárdio e possui doenças geriátricas. Faz uso medicamentoso de Losartana, Atenolol e aplica Insulina. Possui uma úlcera no MID, superficial e com tecido de granulação em 100% do leito da úlcera. O tempo de existência da úlcera é de 5 meses (Figura 26). O participante não apresentou hipersensibilidade ao produto.

Com 41 dias de tratamento, ocorreu a reepitelização em 100% do leito da úlcera.

Figura 26: Registro fotográfico do seguimento clínico do participante LC1



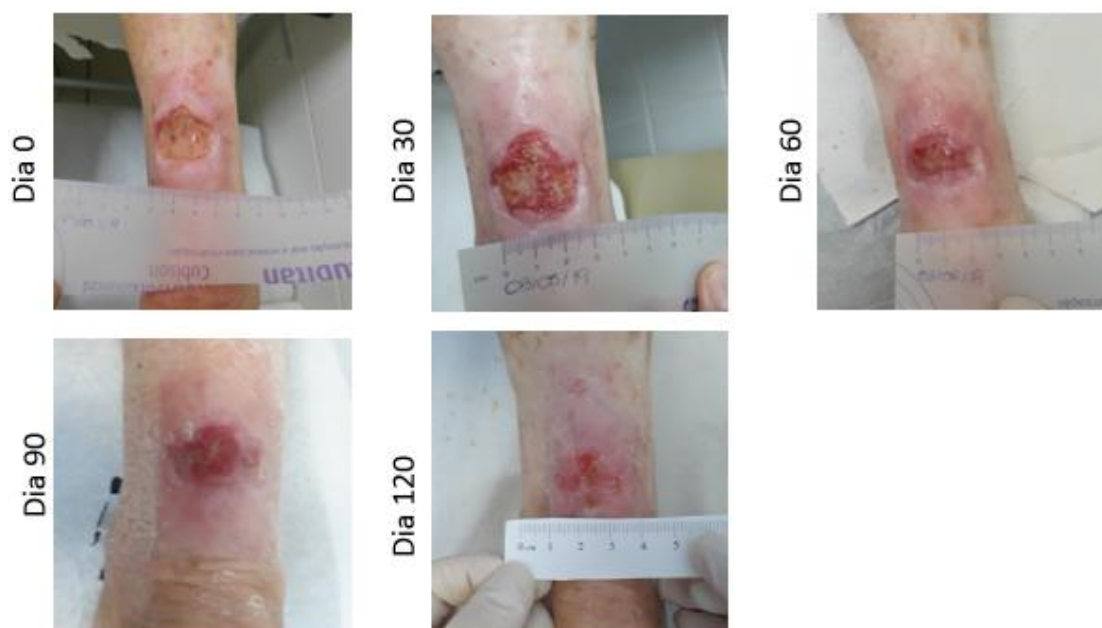
Fonte: Autoria própria.

Participante LC2

Mulher, 85 anos, branca, aposentada e sedentária. Possui diagnóstico de DM tipo 2, HAS, doença vascular e início de Alzheimer. É portadora de uma úlcera localizada no MIE na região posterior do tornozelo, 100% recoberta com esfacelo e profunda, ocasionada por uma bolha que estourou e não foi tratada (Figura 27). O tempo de existência da úlcera é de 3 anos e 6 meses de existência. A participante não apresentou hipersensibilidade ao produto.

Com 30 dias de tratamento, foi possível observar o rápido crescimento do tecido de granulação, tornando a úlcera superficial. A úlcera reepitelizou em 100% da sua área com 120 dias de tratamento. Ao longo do tratamento, foi observado que as bordas da úlcera apresentavam vermelhidão.

Figura 27: Registro fotográfico do seguimento clínico do participante LC2



Fonte: Autoria própria.

Participante LC3

Homem, 65 anos, branco, dono de bar e sedentário. Possui diagnóstico de DM tipo 2 e doença vascular. Possui úlcera no MIE, superficial e com esfacelo em 100% do leito da úlcera (Figura 28). O tempo de existência da úlcera é de 45 dias. O participante não apresentou hipersensibilidade ao produto.

Com 43 dias de tratamento, ocorreu a reepitelização em 100% do leito da úlcera. Ao longo do tratamento, foi observado que as bordas da úlcera apresentavam vermelhidão.

Figura 28: Registro fotográfico do seguimento clínico do participante LC3



Fonte: Autoria própria.

A Tabela 6 resume a evolução dos pacientes, indicando o tempo de ulceração, tempo de tratamento e índice de cicatrização da úlcera (ICU) relativo aos dias 30, 60, 90 e 120. Assim como no grupo anterior, houveram participantes em que suas úlceras foram cicatrizadas em tempo menor que 60 dias e 90 dias e estão sinalizados na tabela 6 com o ICU de 100%.

Tabela 6: Índice de cicatrização das úlceras (ICU) dos participantes do grupo teste de acordo com o tempo de úlcera e porcentagem de cicatrização nos dias 30, 60, 90, 120 e ao final do tratamento

Paciente	Tempo de úlcera	Tempo de tratamento (dias)	ICU 30 (%)	até 30 dias	ICU até 60 dias (%)	até 60 dias	ICU até 90 dias (%)	até 90 dias	ICU 120 (%)	até 120 dias	ICU final (%)
LC1	5 meses	41	90,56	100	100		100		100		100
LC2	3 anos e 6 meses	120	15,92	64,44	89,31		100		100		100
LC3	45 dias	43	78,76	100	100		100		100		100

Fonte: Autoria própria.

O menor tempo de ulceração foi de 45 dias, enquanto o maior tempo foi de 3 anos e 6 meses. Em relação ao tempo de tratamento, o menor foi 41 dias,

enquanto o maior tempo foi de 120 dias. Todos os participantes tiveram suas úlceras com ICU de 100%.

Apenas uma participante (LC2) ultrapassou a data limite do protocolo previsto para o projeto de pesquisa (90 dias), provavelmente devido à extensa quantidade de esfacelo que recobria todo o leito da úlcera e devido à profundidade apresentada.

Em relação aos participantes LC1 e LC3, foi possível observar uma melhora significativa em dias semelhantes, pois as úlceras possuíam tamanhos, localização e aspectos semelhantes.

4.3.4 Discussão acerca dos casos clínicos

Em um participante do grupo G1 foi necessária a antibioticoterapia via oral para conter a infecção bacteriana presente no leito da úlcera. Essa conduta foi essencial para promover a melhora no quadro de cicatrização da úlcera, pois uma vez que a contaminação se instala, é necessário o tratamento com agentes antimicrobianos que não interferem na eficácia do produto usado como agente cicatrizante (FRYKEBERG & BANKS, 2015 e GAME *et al.*, 2016).

Caso haja contaminação no leito da úlcera, a cicatrização não ocorre naturalmente e desse modo, é necessária a intervenção com agentes antimicrobianos. Apesar de não ser um agente especialmente cicatrizante, é de suma importância, pois mantém o leito da úlcera saudável para que a reepitelização seja efetiva. Assim, esse tipo de intervenção pode ser associado ao tratamento com a membrana de látex/membrana de látex+colágeno ou qualquer outro produto com ação cicatrizante sem interferir na ação do mesmo (FRYKEBERG & BANKS, 2015 E GAME *et al.*, 2016).

Uma alternativa interessante, seria adicionar tais agentes na membrana de látex natural, para potencializar os efeitos positivos que o curativo tem mostrado. A literatura tem reportado alguns estudos em que houve a incorporação de alguns antimicrobianos, como moxifloxacina que tem ação antibiótica (GARMS *et al.*, 2019) e própolis, que possui ação antifúngica (ZANCANELA *et al.*, 2017). Em ambos os trabalhos, os agentes foram liberados da membrana de látex natural sem que ocorressem mudanças nas suas

estruturas químicas, mantendo sua função biológica e, portanto, sendo eficazes na eliminação de microrganismos.

Outro participante (L1) do grupo G1 apresentou bordas queratóticas e necessitou de desbridamento ou desbastamento frequente para auxiliar na reepitelização tecidual. Este processo necessário está associado a cicatrização mais rápida (YAZDANPANA, 2015), facilitando a reepitelização (KÖNIG *et al.*, 2005), pois retira o tecido desvitalizado. O desbridamento mecânico realizado nas úlceras que apresentaram hiperqueratose ou tecido desvitalizado nas bordas juntamente com o desbridamento do esfacelo no leito da úlcera promovido pela membrana de látex natural, proporcionaram um ambiente propício para a reepitelização, otimizando a cicatrização (SILVA, 2015).

A média do tempo de tratamento dos participantes do Grupo 1 foi de 120,6 (DP±43,2) dias. Entretanto no G2, a média foi de 68 (DP±45,0) dias. Os valores encontrados se aproximam do tempo previsto para o protocolo da pesquisa (90 dias).

Em relação à cicatrização completa, 66,6% dos participantes do G1 tiveram suas úlceras totalmente reepitelizadas e no G2, 100% dos participantes obtiveram sucesso na cicatrização. As membranas apresentaram comportamento semelhante proporcionando evolução parecida quanto ao tempo de cicatrização e potencial angiogênico, sendo influenciadas pelo tempo de surgimento da úlcera, comportamento do indivíduo quanto aos cuidados com o curativo e interferência de fatores externos como infecções bacterianas.

O tratamento de úlceras crônicas complicadas pelo diabetes, deve ser levado em conta todas as comorbidades que o indivíduo possa apresentar, portanto, pode ser necessário mais de um tipo de tratamento curativo para que a úlcera tenha sucesso na reepitelização.

Lavery *et al.* (2014) compararam a eficácia do Grafix®, um composto criopreservado derivado de membrana placentária (rico em colágeno, fatores de crescimento e células tronco mesenquimais e epiteliais) com o tratamento padrão em úlceras do pé diabético. Os pesquisadores observaram que 62% dos participantes que fizeram o uso do Grafix® tiveram suas úlceras completamente cicatrizadas, contra 21% dos pacientes do grupo que recebeu o tratamento padrão. Além disso, outro estudo que comparou diversos tipos de tratamento, incluindo o curativo feito com Grafix®, chegou à conclusão de que esse composto

possui bom custo-benefício, por ter custo semelhante a outros tratamentos e ser mais eficaz (GIBBONS, 2015).

No que diz respeito ao poder angiogênico promovido pelo látex natural, presente nas duas membranas avaliadas, o que caracteriza a neoformação de vasos sanguíneos naquela região. A mesma característica foi observada por Frade *et al.* (2006), um dos pioneiros no estudo clínico do curativo a base de látex natural em úlceras crônicas.

Frade *et al.* (2004) avaliaram membranas de látex natural quanto a cicatrização de úlceras crônicas de pele em diferentes etiologias em indivíduos diabéticos. Os autores identificaram que o material é econômico, de fácil manipulação, e um curativo de alta eficiência, principalmente pelo seu potencial de desbridamento e sua atividade angiogênica, permitindo o processo de cicatrização rápido e dinâmico, essencial em úlceras diabéticas.

6. Conclusões

As membranas de látex e látex com colágeno apresentam características que definem um bom curativo e não causam dano às células humanas, podendo ser ótimas candidatas para aplicações biomédicas em humanos.

Em relação à aplicação clínica, conclui-se que a membrana de látex natural incorporada com colágeno pode ser uma alternativa interessante de tratamento para úlceras crônicas complicadas pelo DM.

7. Perspectivas

Futuramente, a ideia é expandir o trabalho, iniciando o recrutamento de mais participantes, com parcerias em outras cidades ou hospitais que possibilitem a realização dos curativos, bem como locais que facilitem o agrupamento dos participantes.

Também seria interessante, a realização de um estudo comparando a membrana de látex natural incorporada com colágeno frente a os outros curativos disponíveis comercialmente para ver se esse novo produto tem potencial para ser uma alternativa realmente viável e barata no curativo de úlceras crônicas.

Além disso, como já mencionado, para potencializar os efeitos cicatrizantes dessa membrana e a fim de manter o leito da úlcera saudável para que ocorra a reepitelização com sucesso, seria interessante adicionar compostos bioativos com atividades antibacterianas e/ou fungicidas, como extratos vegetais ou própolis. Apesar desses compostos não serem potencialmente cicatrizantes, são de extrema importância na manutenção do leito da úlcera saudável, são vantajosos economicamente, além de provavelmente diminuir a necessidade de medicação via oral que o indivíduo possa vir a precisar.

8. Referências

- AFONSO, Ana *et al.* Úlcera crônica do membro inferior — experiência com cinquenta doentes. **Angiologia e Cirurgia Vascular**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 148-153, dez. 2013. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1646-706x\(13\)70035-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1646-706x(13)70035-1).
- AGOSTINI, Deuber Lincon da Silva. **Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese**. 2009. 87 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2009.
- AKTURK, O. *et al.* Collagen/gold nanoparticle nanocomposites: A potential skin wound healing biomaterial. **Journal of Biomaterials Applications**, [s. l.], v. 31, n. 2, p.283-301, 9 jul. 2016.
- ALMEIDA, Carla Albertina Martins. Estudo das alterações estruturais e ultra-estruturais da camada de fotorreceptores da retina de ratos diabéticos aloxânicos. 2002. 152 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado, Universidade Estadual Paulista – Unesp, Botucatu, 2002.
- ALMEIDA, G. Hidrogel de gengibre criado por pesquisador brasileiro evita amputação em diabéticos. **Ciencianautas**. [S. l.], 21 jun 2019. Disponível em <https://ciencianautas.com/hidrogel-de-gengibre-criado-por-pesquisador-brasileiro-evita-amputacao-em-diabeticos/?fbclid=IwAR21dckdAFMAe8r5mnd6oSbkC7-JVb5-P-6FhElR8CYwZgNeg8gatSVxKHA>. Acesso em 30 ago 2019.
- ANDRADE, T.A.M. *et al.* The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [S.L.], v. 44, n. 10, p. 1036-1047, out. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-879x2011007500116>.
- ANSARI, Anwaar Hazaar; JAKARNI, Fauzan Mohd; MUNIANDY, Ratnasamy; HASSIM, Salihudin; ELAHI, Zafreen. Natural rubber as a renewable and sustainable bio-modifier for pavement applications: a review. **Journal Of Cleaner Production**, [S.L.], p. 1-7, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125727>.
- APELQVIST, J.; LARSSON, J.; AGARDH, C. D. Long-term prognosis for diabetic patients with foot ulcers. **Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 233, n. 6, p.485-491, jun. 1993.

- ARGYROPOULOS, Angela J. *et al.* Alterations of Dermal Connective Tissue Collagen in Diabetes: molecular basis of aged-appearing skin. **Plos One**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 1-7, 22 abr. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0153806>.
- ARMSTRONG, D. G.; BOULTON, A. J. M.; BUS, S. A. Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 376, n. 24, p.2367-2375, 15 jun. 2017.
- ARNOLD, F. E WEST D. C. Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther*, v.52, n.3, Dec, p.407-422. 1991.
- ATAIDE, J. A. *et al.* Bacterial Nanocellulose Loaded with Bromelain: Assessment of Antimicrobial, Antioxidant and Physical-Chemical Properties. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p.1-9, dez. 2017.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 1, p.27-51, mar. 2005.
- BARROS, N. R. de *et al.* Natural rubber latex biodevice as controlled release system for chronic wounds healing. **Biomedical Physics & Engineering Express**, Araraquara, p.1-25, 2018.
- BARROS, N. R. de *et al.* Natural rubber latex biodevice as controlled release system for chronic wounds healing. *Biomedical Physics & Engineering Express*, Araraquara, p.1-25, 2018.
- BARROS, N. R., *et al.* Natural rubber latex: Development and in vitro characterization of a future transdermal patch for enuresis treatment. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, v. 66, n. 17, p. 871-876, 2017.
- BARROS, N.R.; *et al.* Oxytocin Sustained Release Using Natural Rubber Latex Membranes. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 22, p. 435-444, 2016.
- BARROS, Natan Roberto de. **Desenvolvimento de blendas poliméricas de látex-alginato e látex-colágeno para aplicação em engenharia de tecidos**. 2020. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista – Unesp, Araraquara, 2020.
- BARROS, Natan Roberto *et al.* Natural latex-glycerol dressing to reduce nipple pain and healing the skin in breastfeeding women. **Skin Research And**

Technology, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 461-468, 9 jan. 2019. Wiley.

<http://dx.doi.org/10.1111/srt.12674>.

BAYNEST, H. W. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. **Journal Of Diabetes & Metabolism**, [s. l.], v. 06, n. 05, p.1-9, 2015.

BLAABJERG, M. S. B. *et al.* Decrease in the rate of sensitization and clinical allergy to natural rubber latex. **Contact Dermatitis**, [s. l.], v. 73, n. 1, p.21-28, 25 mar. 2015.

BORGES, F. A. *et al.* Novel sustained-release of *Stryphnodendron obovatum* leaves extract using natural rubber latex as carrier. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, Assis, v. 6, n. 36, p.379-384, 2015.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The Basic Science of Wound Healing. **Plastic And Reconstructive Surgery**, [s. l.], v. 117, p.12-34, June 2006.

CALSOLARI, M. R. *et al.* Diabetes Auto-Imune Latente do Adulto ou Diabetes Melito Tipo 2 Magro? **Arq Bras Endocrinol Metab**, Belo Horizonte, v. 2, n. 52, p.315-321, jan. 2008.

CAMPOS, Antonio Carlos Ligocki; BORGES-BRANCO, Alessandra; GROTH, Anne Karoline. Cicatrização de Feridas. **Arq Bras Cir Dig**, Curitiba, v. 1, n. 20, p.51-58, 2007.

CAMPOS, M. G. das C. A. *et al.* **Feridas Complexas e Estomias: Aspectos preventivos e manejo clínico.** João Pessoa: Ideia, 2016. 398 p.

CARVALHO, F. A. *et al.* Natural membranes of *Hevea brasiliensis* latex as delivery system for *Casearia sylvestris* leaf components. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 28, n. 1, p.102-110, jan. 2018.

CASTRO, Elisabete. O Papel dos Produtos Finais de Glicosilação Avançada na Nefropatia Diabética. **Arq Med. Porto**, p. 28-37. fev. 2011.

CESAR, Mariana Biondi *et al.* Development and Characterization of Natural Rubber Latex and Polylactic Acid Membranes for Biomedical Application. **Journal Of Polymers And The Environment**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 220-230, 31 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1007/s10924-019-01596-8>.

- CHATTOPADHYAY, Sayani; RAINES, Ronald T.. Collagen-based biomaterials for wound healing. **Biopolymers**, [S.L.], v. 101, n. 8, p. 821-833, 27 maio 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bip.22486>.
- CHOUDHURY, A. J. *et al.* Controlled antibiotic-releasing *Antheraea assama* silk fibroin suture for infection prevention and fast wound healing. **Surgery**, [S. I.], v. 159, n. 2, p.539-547, fev. 2016.
- COSTA, Rafael Henrique Rodrigues *et al.* Diabetic foot ulcer carries high amputation and mortality rates, particularly in the presence of advanced age, peripheral artery disease and anemia. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, [S.L.], v. 11, p. 583-587, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsx.2017.04.008>.
- DANG, Qifeng *et al.* Fabrication and evaluation of thermosensitive chitosan/collagen/ α , β -glycerophosphate hydrogels for tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 167, p. 145-157, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.053>.
- SILVA, Rosângela Gonçalves da *et al.* **Biomembrana com extratos vegetais para tratamento de úlceras cutâneas**. Titular: Unesp. BR n. BR 1020170217531. Depósito: 09 out. 2017. Concessão: 09 out. 2017.
- DESHMANE, S. L. *et al.* Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, [S. I.], v. 29, n. 6, p.313-326, jun. 2009.
- DIPIETRO, Luisa A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. I.], v. 100, n. 5, p.979-984, 12 jul. 2016.
- DREIFKE, M. B.; JAYASURIYA, A. A.; JAYASURIYA, A. C. Current wound healing procedures and potential care. **Materials Science And Engineering: C**, [S. I.], v. 48, p.651-662, mar. 2015.
- EDMONDS, Michael *et al.* Apligraf in the Treatment of Neuropathic Diabetic Foot Ulcers. **The International Journal Of Lower Extremity Wounds**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 11-18, 3 fev. 2009. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1534734609331597>.
- FARAGE, M. A. *et al.* Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. **International Journal Of Cosmetic Science**. California, p. 87-95. set. 2007.
- FERREIRA, L. T. *et al.* Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, Santo André, v. 3, n. 36, p.182-188, dez. 2011.

- FLOR, L. S.; CAMPOS, M. R. Prevalência de diabetes mellitus e fatores associados na população adulta brasileira: evidências de um inquérito de base populacional. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [s. l.], v. 20, n. 1, p.16-29, mar. 2017.
- FLORIANO, J. F. *et al.* Ketoprofen Loaded in Natural Rubber Latex Transdermal Patch for Tendinitis Treatment. **Journal of Polymers And The Environment**, [s. l.], v. 26, n. 6, p.2281-2289, 10 out. 2017.
- FOLKMAN, J. e D'AMORE, P. A. Blood vessel formation: what is its molecular basis? **Cell**, v.87, n.7, Dec 27, p.1153-1155. 1996.
- FOROUHI, Nita Gandhi; WAREHAM, Nicholas J.. Epidemiology of diabetes. *Medicine*, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 22-27, jan. 2019. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.10.004>.
- FRADE, M. A., R. V. Valverde, *et al.* Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. *Int J Dermatol*, v.40, n.3, Mar, p.238-240. 2001.
- FRADE, Marco Andrey Cipriani *et al.* Biomembrana natural como uma nova proposta de tratamento para as úlceras de pressão. **Med Cutan Iber Lat Am**, Ribeirão Preto, v. 34, n. 3, p. 133-138, jan. 2006.
- FRADE, Marco Andrey Cipriani *et al.* Manegment of Diabetic Skin Wounds with a Natural Latex Biomembrane. **Medicina Cutanea Ibero-Latino-America**, [S.l.], v. 4, n. 32, p. 157-162, jan. 2004.
- FRADE, Marco Andrey Cipriani *et al.* The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 87, n. 1, p.45-51, fev. 2012.
- FRYKBERG, R. G.; BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. **Advances In Wound Care**, [s. l.], v. 4, n. 9, p.560-582, set. 2015.
- FURUKAWA, S. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal Of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 114, n. 12, p.1752-1761, 15 dez. 2004.
- GALVÃO, E. Esterilização por Óxido de Etileno. Multisaúde Educacional. [S. l.], 2017. Disponível em <https://multisaude.com.br/artigos/esterilizacao-por-oxido-de-etileno/>. Acesso em 30 ago 2019.
- GALVÃO, E. Esterilização por Óxido de Etileno. Multisaúde Educacional. [S. l.], 2017. Disponível em <https://multisaude.com.br/artigos/esterilizacao-por-oxido-de-etileno/>. Acesso em 30 ago 2019.

GAME, F. L. *et al.* Effectiveness of interventions to enhance healing of chronic ulcers of the foot in diabetes: a systematic review. **Diabetes/metabolism**

Research And Reviews, [s. l.], v. 32, n. 1, p.154-168, jan. 2016.

GARMS, B. *et al.* Characterization and Microbiological Application of Ciprofloxacin Loaded in Natural Rubber Latex Membranes. **British Journal Of Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 15, n. 1, p.1-10, 10 jan. 2017.

GARMS, Bruna Cambraia *et al.* Novel polymeric dressing to the treatment of infected chronic wound. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 103, n. 12, p. 4767-4778, 7 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-019-09699-x>.

GAWCHIK, S. M. Latex Allergy. **Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine**, [s. l.], v. 78, n. 5, p.759-772, set. 2011.

GE, Liming; XU, Yongbin; LI, Xinying; YUAN, Lun; TAN, Huan; LI, Defu; MU, Changdao. Fabrication of Antibacterial Collagen-Based Composite Wound Dressing. **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, [S.L.], v. 6, n. 7, p. 9153-9166, 29 maio 2018. American Chemical Society (ACS).

<http://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01482>.

GEMEINDER, José Lúcio Pádua *et al.* Gentamicin encapsulated within a biopolymer for the treatment of Staphylococcus aureus and Escherichia coli infected skin ulcers. **Journal Of Biomaterials Science, Polymer Edition**, [S.L.], p. 1-19, 8 set. 2020. Informa UK Limited.

<http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2020.1817667>.

GEMEINDER, José Lúcio Pádua. **Desenvolvimento e avaliação de um sistema de liberação sustentada de gentamicina em biomembranas de látex natural**. 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Assis, 2016.

GIBBONS, G. W. Graftix®, a Cryopreserved Placental Membrane, for the Treatment of Chronic/Stalled Wounds. **Advances In Wound Care**, [s. l.], v. 4, n. 9, p.534-544, set. 2015.

GIBBONS, G. W. Graftix®, a Cryopreserved Placental Membrane, for the Treatment of Chronic/Stalled Wounds. **Advances In Wound Care**, [s. l.], v. 4, n. 9, p.534-544, set. 2015.

- GONZALEZ, A. C. de O. *et al.* Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 91, n. 5, p.614-620, out. 2016.
- HAMZAH, Mohd Syahir Anwar *et al.* Entrapment of collagen on polylactic acid 3D scaffold surface as a potential artificial bone replacement. **Materials Today: Proceedings**, [S.L.], v. 46, n. 4, p. 1668-1673, 2021. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2020.07.263>.
- HARRIS, S. K.; WILSON, D. G.; MCLAFFERTY, R. B. Wound Care Management for Venous Ulcers. **Current Management Of Venous Diseases**, [s. l.], p.453-461, 10 dez. 2017.
- HAYCOCKS, S. *et al.* Collagen matrix wound dressings and the treatment of DFUs. **Journal Of Wound Care**, [S.L.], v. 22, n. 7, p. 369-375, jul. 2013. Mark Allen Group.
<http://dx.doi.org/10.12968/jowc.2013.22.7.369>.
- HE, W.; BENSON, R. Polymeric Biomaterials. **Applied Plastics Engineering Handbook**, [s. l.], p.145-164, 2017. Elsevier.
- HENKELMAN, Sandra *et al.* Standardization of incubation conditions for hemolysis testing of biomaterials. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 29, n. 5, p. 1650-1654, jun. 2009. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2009.01.002>.
- HUDECKI, A.; KIRYCZYŃSKI, G.; LOS, M. J.; Biomaterials, Definition, Overview *In* HUDECKI, A.; KIRYCZYŃSKI, G.; LOS, M. J. (ed). **Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine**. New York: Academic Press, 2019. Chap. 7, p. 85-98.
- INDRANI, D J; LUKITOWATI, F; YULIZAR, Y. Preparation of Chitosan/Collagen Blend Membranes for Wound Dressing: a study on ftir spectroscopy and mechanical properties.**Iop Conference Series: Materials Science and Engineering**, [S.L.], v. 202, p. 1-10, maio 2017. IOP Publishing.
<http://dx.doi.org/10.1088/1757-899x/202/1/012020>.
- INDUSTRY EXPERTS, **Biomaterials: A Global Market Overview**. Hydenabad, 2018. Disponível em: <http://industry-experts.com/verticals/biotechnology/biomaterials-a-global-market-overview>. Acesso em 30 ago 2019.
- JARNTHONG, Methakarn; LIAO, Lusheng; ZHANG, Fuquan; WANG, Yueqiong; LI, Puwang; PENG, Zheng; MALAWET, Chutarat; INTHARAPAT, Punyanich. Characterization of interaction between natural rubber and silica by

FTIR. **Aip Conf. Proc.**, [S.L.], p. 1-5, 2017. Author(s).

<http://dx.doi.org/10.1063/1.4983595>.

JOHNSON, Joel *et al.* Potential for Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy toward predicting antioxidant and phenolic contents in powdered plant matrices. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S.L.], v. 233, n. 1, p. 1-25, jun. 2020. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2020.118228>.

Karukonda, S. R., *et al.* The effects of drugs on wound healing--part II. Specific classes of drugs and their effect on healing wounds. **Int. J. Dermatol.**, v.39, n.5, May, p.321-33. 2000.

KATULANDA, P.; RANASINGHE, P.; JAYAWARDENA, R. Prevalence of retinopathy among adults with self-reported diabetes mellitus: the Sri Lanka diabetes and Cardiovascular Study. **Bmc Ophthalmology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p.1-8, 20 ago. 2014.

KERCHE-SILVA, L. E.; CAVALCANTE, D. G. S. M.; JOB, A. E. Natural Rubber Latex Biomaterials in Bone Regenerative Medicine. **Biomaterials In Regenerative Medicine**, [s. l.], p.302-317, 14 fev. 2018.

KIM, D. *et al.* Oral Intake of Low-Molecular-Weight Collagen Peptide Improves Hydration, Elasticity, and Wrinkling in Human Skin: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. **Nutrients**, [s. l.], v. 10, n. 7, p.826-839, 26 jun. 2018.

KÖNIG, M. *et al.* Enzymatic versus autolytic debridement of chronic leg ulcers: a prospective randomised trial. **Journal Of Wound Care**. Alemanha, p. 320-323. jul. 2005.

KORAC, Bato; KALEZIC, Andjelika; PEKOVIC-VAUGHAN, Vanja; KORAC, Aleksandra; JANKOVIC, Aleksandra. Redox changes in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. **Redox Biology**, [S.L.], v. 42, p. 101887, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2021.101887>.

KRUPP, T. *et al.* NATURAL RUBBER - PROPOLIS MEMBRANE IMPROVES WOUND HEALING IN SECOND-DEGREE BURNING MODEL. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 131, p.980-988, jun. 2019.

KYAW, B; JÄRBRINK, K; MARTINENGO, L; CAR, J; HARDING, K; A SCHMIDTCHEN,. Need for Improved Definition of "Chronic Wounds" in Clinical

Studies. **Acta Dermato Venereologica**, [S.L.], v. 98, n. 1, p. 157-158, 2018.

Acta Dermato-Venereologica. <http://dx.doi.org/10.2340/00015555-2786>.

LAVERY, L. A. *et al.* The efficacy and safety of Grafix® for the treatment of chronic diabetic foot ulcers: results of a multi-centre, controlled, randomised, blinded, clinical trial. **International Wound Journal**, [s. l.], v. 11, n. 5, p.554-560, 21 jul. 2014.

LEITE, M.N. **Eficácia do soro do látex natural da seringueira Hevea brasiliensis na cicatrização de escoriações cutâneas em ratos**. 2016. 76f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

LENSELINK, E. A. Role of fibronectin in normal wound healing. **International Wound Journal**, [s. l.], v. 12, n. 3, p.313-316, 7 jun. 2013.

LESLIE, R. D. *et al.* Diabetes at the crossroads: relevance of disease classification to pathophysiology and treatment. **Diabetologia**, [s. l.], v. 59, n. 1, p.13-20, 24 out. 2015.

LIMA-JUNIOR, E. M. *et al.* Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. *Revista brasileira de queimaduras*, Limeira, v. 16, n. 1, p.10-17, 2017.

LYE, Chan Boon; AUN, Yeoh Guan; HUAT, Ong Kian. Hevea Bralizens Is Natural Rubber:– A Review on the Macroand Micro-Structure of the Hevea Hydrocarbon Chain in its Natural and Chemical Forms, Especially in the Mma Grafted Hevea Natural Rubbers By IR Spectroscopy Including the ATR FTIR Spectral Analyses. **Research Journal Of Nanoscience And Engineering**, Malaysia, v. 3, n. 3, p. 1-5, 1 jan. 2019.

MADONNA, Rosalinda *et al.* Diabetic microangiopathy: Pathogenetic insights and novel therapeutic approaches. **Vascular Pharmacology**, [s. l.], v. 90, p.1-7, mar. 2017.

MARCELINO, M. Y. *et al.* Antifungal activity of fluconazole-loaded natural rubber latex against *Candida albicans*. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p.359-367, mar. 2018.

MARTIN, P.; NUNAN, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. **British Journal Of Dermatology**, [s. l.], v. 173, n. 2, p.370-378, 14 jul. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bjd.13954>.

- MARTINENGO, Laura; OLSSON, Maja; BAJPAI, Ram; SOLJAK, Michael; UPTON, Zee; SCHMIDTCHEN, Artur; CAR, Josip; JÄRBRINK, Krister. Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. **Annals Of Epidemiology**, [S.L.], v. 29, p. 8-15, jan. 2019. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.10.005>.
- MARWAH, H. *et al.* Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. **Drug Delivery**, [s. l.], v. 23, n. 2, p.564-578, 9 jul. 2014.
- MASSIMINO, L.C., da CONCEIÇÃO AMARO MARTINS, V., VULCANI, V.A.S. *et al.* Use of collagen and auricular cartilage in bioengineering: scaffolds for tissue regeneration. **Cell Tissue Bank** (2020). <https://doi.org/10.1007/s10561-020-09861-0>
- MEDEIROS, M. H. F.; *et al.* Avaliação da Eficiência de Sistemas de Proteção de Superfície para Concreto: Absorção de Água, Migração de Cloretos e Ângulo de Contato. **Revista Matéria**, v. 20, n. 1, p. 145-159, 2015.
- MENDONÇA, R. J. *et al.* Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Phytotherapy Research**, [s. l.], p.764-768, 2009.
- MENDONÇA, R. J. **Purificação e caracterização de uma proteína angiogênica, indutora de fibroplasia e cicatrizante presente no Látex Natural da Seringueira *Hevea brasiliensis***. 2008. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.
- MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Cellular aspects of wound healing. **Ann. Bras. Dermatol.**, v.84, n.3, p.257-62. 2009.
- MEYER, Michael. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. **Biomedical Engineering Online**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-74, 18 mar. 2019. **Springer Science and Business Media LLC**.
<http://dx.doi.org/10.1186/s12938-019-0647-0>.
- MEYER, Michael. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. **Biomed Eng Online**, [s. l.], v. 24, n. 18, p. 1-74, fev. 2019.
- MICHALSKA-SIONKOWSKA, Marta *et al.* Preparation and Characterization of Fish Skin Collagen Material Modified with β -Glucan as Potential Wound Dressing. **Materials**, [S.I.], v. 6, n. 14, p. 1-17, mar. 2021.

- MIOT, Hélio Amante. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **J Vasc Bras**, Botucatu, v. 4, n. 10, p. 275-278, abr. 2011.
- MIRANDA, M. C. R. **Desenvolvimento e estudo toxicológico em métodos alternativos dos compósitos à base de látex natural e fosfatos de cálcio para reparação óssea**. 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.
- MIRANDA, M. C. R., *et al.* Porosity effects of natural latex (*Hevea brasiliensis*) on release of compounds for biomedical applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 28, n.18, p. 2117-2130, 2017.
- MOHAMMED, Azad; ABDULLAH, Avin. Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review. **Proceedings Of 2018 International Conference On Hydraulics And Pneumatics**, [S.I.], v. 8003, n. 1454, p. 1-10, nov. 2018.
- MONTEIRO, I. P. *et al.* Spray-assisted layer-by-layer assembly on hyaluronic acid scaffolds for skin tissue engineering. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, [s. l.], v. 103, n. 1, p.330-340, 3 abr. 2014.
- MONTEIRO-SOARES, M. *et al.* Predictive factors for diabetic foot ulceration: a systematic review. **Diabetes/metabolism Research And Reviews**, [s.l.], v. 28, n. 7, p.574-600, out. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.2319>.
- MORISE, B. T. *et al.* Scopolamine loaded in natural rubber latex as a future transdermal patch for sialorrhea treatment. **International Journal Of Polymeric Materials And Polymeric Biomaterials**, [S.L.], v. 68, n. 13, p. 788-795, 10 out. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00914037.2018.1506984>.
- MORISE, Beatriz Tiemi *et al.* Evaluation of acrylic acid grafting on the loading and release of scopolamine butylbromide from polymeric matrices for future sialorrhea treatment. **J Appl Polym Sci**, v. 138, n. 13, p. 1-13, out. 2020.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth a Survival Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunology Methods*, v.65, n.1/2, p. 55-63, 1983.
- MOTLEY, T. A. *et al.* Clinical Outcomes for Diabetic Foot Ulcers Treated with Clostridial Collagenase Ointment or with a Product Containing Silver. **Advances In Wound Care**, [s. l.], v. 7, n. 10, p.339-348, out. 2018.
- MOUSAVI, Saba; KHOSHFEETRAT, Ali Baradar; KHATAMI, Neda; AHMADIAN, Mehri; RAHBARGHAZI, Reza. Comparative study of collagen and gelatin in chitosan-based hydrogels for effective wound dressing: physical properties and

fibroblastic cell behavior. **Biochemical And Biophysical Research**

Communications, [S.L.], v. 518, n. 4, p. 625-631, out. 2019. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.102>.

MRUÉ F. **Substituição do esôfago cervical por prótese biossintética de látex. Estudo experimental em cães**. [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 1996.

MRUÉ, F. **Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade em neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães** [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2000.

MRUÉ, F., COUTINHO-NETTO, J. *et al.* Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. *Materials Research*, v.7, n.2, p.277-283. 2004.

MRUÉ, F.; COUTINHONETTO, J.; CENEVIVAA, R. *et al.* Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. *Mater. Res.*, v.7, p.277-283, 2004.

NAÇÕES UNIDAS BRASIL. Apesar de baixa fertilidade, mundo terá 9,8 bilhões de pessoas em 2050. **Nações Unidas Brasil**. [S. l.], 22 jun 2017. Disponível em <https://nacoesunidas.org/apesar-de-baixa-fertilidade-mundo-tera-98-bilhoes-de-pessoas-em-2050/>. Acesso em 30 ago 2019.

NASCIMENTO, Andreia Braga do *et al.* O USO DA PELE DE TILÁPIA NO TRATAMENTO DE QUEIMADURAS. **Temas em Saúde - Edição Especial**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 128-143, 2020. Even3. <http://dx.doi.org/10.29327/216797.1.1-6>.

NASCIMENTO, Osvaldo José Moreira do; PUPE, Camila Castelo Branco; CAVALCANTI, Eduardo Boiteux Uchôa. Neuropatia Diabética. **Rev Dor. São Paulo**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 46-51, fev. 2016.

NAWAMAWAT, Kanjanee *et al.* Surface nanostructure of Hevea brasiliensis natural rubber latex particles. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical And Engineering Aspects**, [s. l.], v. 1, n. 390, p. 157-166, set. 2011.

NEHRING, Piotr *et al.* Risk factors of diabetic foot of neuropathic origin in patients with type 2 diabetes. **Endokrynologia Polska**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.10-14, 2 mar. 2015. VM Media SP. zo.o VM Group SK. <http://dx.doi.org/10.5603/ep.2015.0003>.

NILFOROUSHZADEH, M. A. *et al.* Skin care and rejuvenation by cosmeceutical facial mask. **Journal Of Cosmetic Dermatology**, [s. l.], v. 17, n. 5, p.693-702, 21 ago. 2018.

NOLAN, Christopher J; DAMM, Peter; PRENTKI, Marc. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. **The Lancet**. Canberra, v. 378, n. 1, p. 169-181, 9 jul. 2011.

NUSSBAUM, Samuel R. *et al.* An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds. **Value In Health**, [s. l.], v. 21, n. 1, p.27-32, jan. 2018.

OLIVEIRA JAA, HIPÓLITO MA, COUTINHO-NETTO J. La regeneration du tympan avec l'utilisation de matériel biosynthétique nouveau. In: Congres Français d'Otorrhino-laryngologie et de chirurgie de la face et du cou. Paris 1999; Annais. p. 273.

OLSSON, Maja *et al.* The humanistic and economic burden of chronic wounds: A systematic review. **Wound Repair And Regeneration**, Singapura, v. 27, n. 1, p. 114-125, out. 2018.

PARK, Joon; LAKES, R. S.. **Biomaterials**: an introduction. 3. ed. Nova York: Springer-Verlag, 2007. 562 p.

PAWLACZYK, Mariola; LELONKIEWICZ, Monika; WIECZOROWSKI, Michał. Age-dependent biomechanical properties of the skin. **Postepy Dermatol Alergol**, [s. l.], v. 5, n. 30, p. 302-306, out. 2013.

PESQUISADORES da UFV criam pomada a base de urucum que acelera a cicatrização de lesões profundas na pele. Diário do aço, Ipatinga, 26 jan 2017. Disponível em <https://www.diariodoaco.com.br/noticia/0047575-pesquisadores-da-ufv-criam-pomada-a-base-de-urucum-que-acelera-a-cicatrizaaaao-de-lesaes-profundas-na-pele>. Acesso em 30 ago 2019.

PETRIE, J. R.; GUZIK, T. J.; TOUYZ, R. M. Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. **Canadian Journal Of Cardiology**, [s. l.], v. 34, n. 5, p.575-584, maio 2018.

PHAECHAMUD, T.; ISSARAYUNGYUEN, P.; PICHAYAKORN, W. Gentamicin sulfate-loaded porous natural rubber films for wound dressing. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 85, p.634-644, abr. 2016.

PICHAYAKORN, W. *et al.* Deproteinized natural rubber film forming polymeric solutions for nicotine transdermal delivery. **Pharmaceutical Development And Technology**, [s. l.], v. 18, n. 5, p.1111-1121, 13 ago. 2012.

PINHO, E. C. C. M. de *et al.* Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. **Arq Bras Oftalmol**, Bauru, v. 1, n. 67, p.27-32, jan. 2004.

PIRES, Ana Luiza R.; BIERHALZ, Andréa C. K.; MORAES, Ângela M.. BIOMATERIALS: TYPES, APPLICATIONS, AND MARKET. **Química Nova**, [s.l.], p.957-971, 2015. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>.

POWERS, J. G. *et al.* Wound healing and treating wounds. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, [s. l.], v. 74, n. 4, p.607-625, abr. 2016.

QI, B.; YAN, M.; SUN, Y. Analysis on Correlation between Resistin—420C/G Polymorphism and Type 2 Diabetes Mellitus Macroangiopathy in Han Population of Northeast China. **Journal Of Biosciences And Medicines**, [s. l.], v. 05, n. 12, p.17-23, 2017.

QU, Y. *et al.* The dual delivery of KGF and bFGF by collagen membrane to promote skin wound healing. **Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 6, p.1508-1518, 15 maio 2018.

QUILICI, M. T. V. *et al.* Risk Factors for Foot Amputation in Patients Hospitalized for Diabetic Foot Infection. **Journal Of Diabetes Research**, [s. l.], v. 2016, p.1-8, 2016.

RAMOT, Y. *et al.* Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 107, p.153-162, dez. 2016.

RAULF, M. The Latex Story. **History Of Allergy**, [s. l.], p.248-255, 2014. S. KARGER AG.

RAULF, M. The Latex Story. History Of Allergy, [s. l.], p.248-255, 2014. S. KARGER AG.

REZENDE, Talita Colombi. Preparação e caracterização de hidrogel com nanopartícula de cério, Calendula officinalis ou Bixa orellana L., como potenciais curativos de feridas crônicas. 2018. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2018.

- RIAZ, Tehseen; ZEESHAN, Rabia; ZARIF, Faiza; ILYAS, Kanwal; MUHAMMAD, Nawshad; SAFI, Sher Zaman; RAHIM, Abdur; RIZVI, Syed A. A.; REHMAN, Ihtesham Ur. FTIR analysis of natural and synthetic collagen. **Applied Spectroscopy Reviews**, [S.L.], v. 53, n. 9, p. 703-746, mar. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/05704928.2018.1426595>.
- RICHARD, J. I. *et al.* Effect of Topical Basic Fibroblast Growth Factor on the Healing of Chronic Diabetic Neuropathic Ulcer of the foot: A pilot, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 18, n. 1, p.64-69, 1 jan. 1995.
- RIDDLE, Matthew C.. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: standards of medical care in diabetes?2020. **Diabetes Care**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 14-31, 20 dez. 2019. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/dc20-s002>.
- ROBERTS, C. D.; LEAPER, D. J.; ASSADIAN, O. The Role of Topical Antiseptic Agents Within Antimicrobial Stewardship Strategies for Prevention and Treatment of Surgical Site and Chronic Open Wound Infection. **Advances In Wound Care**, [s. l.], v. 6, n. 2, p.63-71, fev. 2017.
- RODRIGUES, A. B. *et al.* Multidisciplinary care of diabetic feet. **Scientific Journal Of The Foot & Ankle**, [s. l.], v. 13, n. 1, p.70-76, 31 mar. 2019.
- ROSA, S. S. R. F. *et al.* Regeneration of Diabetic Foot Ulcers Based on Therapy with Red LED Light and a Natural Latex Biomembrane. **Annals Of Biomedical Engineering**, [s. l.], v. 47, n. 4, p.1153-1164, 1 fev. 2019.
- RUOSLAHTI, E.; YAMAGUCHI, Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. **Cell**, v.64, n.5, Mar 8, p.867-869. 1991.
- SADEGHI, A. R. *et al.* Surface modification of electrospun PLGA scaffold with collagen for bioengineered skin substitutes. **Materials Science And Engineering: C**, [s. l.], v. 66, p.130-137, set. 2016.
- SADEGHI, A.R. *et al.* Surface modification of electrospun PLGA scaffold with collagen for bioengineered skin substitutes. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 66, p. 130-137, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.073>.
- SADEGHI-AVALSHAHR, Alireza; NOKHASTEHEH, Samira; MOLAVI, Amir Mahdi; KHORSAND-GHAYENI, Mohammad; MAHDAVI-SHAHRI, Meysam. Synthesis and characterization of collagen/PLGA biodegradable skin scaffold

- fibers. **Regenerative Biomaterials**, [S.L.], v. 4, n. 5, p. 309-314, 25 set. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/rb/rbx026>
- SADER, Soraya Lopes et al. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 338-344, dez. 2000. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-76382000000400008>.
- SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Exp. Cell Res.**, v.304, n.1, Mar 10, p.274-286. 2005.
- SANTOS, Klinsmann Carolo dos. Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade anti-diabetogênica do extrato hidroetanólico da folha da *Smallanthus sonchifolius* (yacon) em ratos com Diabetes mellitus experimental. 2018. 67 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado, Universidade Estadual Paulista – Unesp, Botucatu, 2018.
- SASKA, S. Materiais compósitos orgânicos-inorgânicos a base de celulose bacteriana com peptídeos regulatórios de fatores de crescimento, OGP e OGP [10-14], para regeneração óssea. 2011. 222f. **Tese (Doutorado em Biotecnologia)** – Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2011.
- SCHEEN, Andre J.. Pathophysiology of type 2 Diabetes. *Pathophysiology*, Liege, v. 1, n. 12, p. 1-7, 20 jan. 2004.
- SHI, Shih-Chen; CHANG, Ting-Wei. FTIR and Raman study of the structural properties and tribological characteristics of collagen. **Optical And Quantum Electronics**, [S.L.], v. 50, n. 12, p. 1-10, 14 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11082-018-1700-0>.
- SILVA TF, PENNA ALB. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2012; 71(3):530-9
- SILVA, Rosângela Gonçalves da. **Avaliação do potencial cicatrizante de curativos a base de látex natural reforçados com extrato de *Stryphnodendron bartiman Mart.* na cicatrização de úlceras cutâneas.** 2019. 124 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2019.
- SILVA, Rosângela Gonçalves da. **Eficácia da biomembrana de látex natural incorporada com extrato de *Stryphnodendron barbatimam mart.* Na cicatrização de úlceras cutâneas crônicas.** 2015. 131 f. Dissertação

(Mestrado em Biociências) – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2015.

SILVA, Thainá V da *et al.* Voriconazole-natural latex dressings for treating infected *Candida* spp. skin ulcers. **Future Microbiol.**, Araraquara, v. 15, n. 15, p. 1-15, nov. 2020.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N. Engl. J. Med.**, v.341, n.10, Sep 2, p.738-746. 1999.

SMANIOTTO, Pedro Henrique de Souza *et al.* Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas. **Rev Bras Cir Plást.** São Paulo, p. 623-626. jan. 2012.

SOBHANIAN, Parisa; KHORRAM, Mohammad; HASHEMI, Seyedeh-Sara; MOHAMMADI, Aliakbar. Development of nanofibrous collagen-grafted poly (vinyl alcohol)/gelatin/alginate scaffolds as potential skin substitute.

International Journal Of Biological Macromolecules, [S.L.], v. 130, p. 977-987, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.045>.

SORG, H. *et al.* Panta Rhei: Neovascularization, Angiogenesis and Nutritive Perfusion in Wound Healing. **European Surgical Research**, [s. l.], v. 59, n. 3-4, p.232-241, 2018.

SOUZA, Felipe Ravelly Alves de. **Efeitos da reticulação com genipinas em membranas de quitosana/colágeno para potencial uso como biomaterial**. 2018. 74 f. TCC (Graduação) - Curso de Curso de Bacharelado em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos., Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, 2018.

STRATTON, S. *et al.* Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering.

Bioactive Materials, [s. l.], v. 1, n. 2, p.93-108, dez. 2016.

SUN, Leilei *et al.* Characterization of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin collagen and fabrication of collagen sponge as a good biocompatible biomedical material. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 63, p. 229-235, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.08.003>.

TANGSADTHAKUN, Chaonglarp *et al.* Properties of Collagen/Chitosan Scaffolds for Skin Tissue Engineering. **Journal Of Metals, Materials And Minerals**, Bangkok, v. 16, n. 1, p.37-44, jan. 2006.

TATKARE, D. **Biomaterials Market by Type (Metallic, Polymeric, Ceramic, and Natural) and Application (Cardiovascular, Dental, Orthopedic, Wound**

Healing, Plastic, Surgery, Ophthalmology, Tissue Engineering) - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2014 – 2022. Pure Alliede Market Research, 2016. Disponível em:

<https://www.alliedmarketresearch.com/biomaterials-market>. Acesso em 30 ago 2019.

TOSCANO, Cristiana *et al.* Annual Direct Medical Costs of Diabetic Foot Disease in Brazil: a cost of illness study. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 89-102, 8 jan. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph15010089>.

TRACY, L E.; MINASIAN, R. A.; CATERSON, E.j. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. **Advances In Wound Care**, [s. l.], v. 5, n. 3, p.119-136, mar. 2016.

VALAND, Reema *et al.* A review of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 19-38, 15 out. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2019.1675909>.

VAN NETTEN, J. J. et al. Prevention of foot ulcers in the at-risk patient with diabetes: a systematic review. **Diabetes/metabolism Research And Reviews**, [S.L.], v. 32, p. 84-98, jan. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.2701>.

VIDAL, Lucimara. Avaliação do sistema de classificação de risco do pé, proposto pelo grupo de trabalho internacional sobre o pé diabético, Hospital da Policia Militar de Minas Gerais, 2002-2007. 2009. 172 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Infectologia e Medicina Tropical, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

VOLMER-THOLE, Maren; LOBMANN, Ralf. Neuropathy and Diabetic Foot Syndrome. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 917-928, 10 jun. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17060917>.

Wagner,FWJr. "The dysvascular foot:a system for diagnosis and treatment". **FootAnkle**. 1981;2:64-122

WEIL, Tanja; BARZ, Matthias. From Polymers to Functional Biomaterials. **Macromolecular Bioscience**, [s.l.], v. 17, n. 10, p.1-4, out. 2017. **Wiley**. <http://dx.doi.org/10.1002/mabi.201700307>.

XIAO, Y. *et al.* Diabetic wound regeneration using peptide-modified hydrogels to target re-epithelialization. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s. l.], v. 113, n. 40, p.5792-5801, 19 set. 2016.

YANG, Pengyuan *et al.* Study on thermal degradation of cattlehide collagen fibers by simultaneous TG–MS–FTIR. **Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry**, [S.L.], v. 127, n. 3, p. 2005-2012, 13 set. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10973-016-5813-z>.

YAZDANPANA, Leila. Literature review on the management of diabetic foot ulcer. **World Journal Of Diabetes**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 37-53, 2015. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.4239/wjd.v6.i1.37>.

ZACCARDI, F. *et al.* Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. **Postgraduate Medical Journal**, [s. l.], v. 92, n. 1084, p.63-69, 30 nov. 2015.

ZANCANELA, D. C. *et al.* Physical, chemical and antimicrobial implications of the association of propolis with a natural rubber latex membrane. **Materials Letters**, [s. l.], v. 209, p.39-42, dez. 2017.

ZANCANELA, D. C. *et al.* Physical, chemical and antimicrobial implications of the association of propolis with a natural rubber latex membrane. **Materials Letters**, [s. l.], v. 209, p.39-42, dez. 2017.

ZANCANELA, Daniela Cervelle; FUNARI, Cristiano Soleo; HERCULANO, Rondinelli Donizetti; MELLO, Vinicius Moreira; RODRIGUES, Clenilson Martins; BORGES, Felipe Azevedo; BARROS, Natan Roberto de; MARCOS, Caroline Maria; ALMEIDA, Ana Marisa Fusco; GUASTALDI, Antônio Carlos. Natural rubber latex membranes incorporated with three different types of propolis: physical-chemistry and antimicrobial behaviours. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 97, p. 576-582, abr. 2019. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.042>.

ZANOTI, Márcia Diana Umebayashi. **Membranas de Celulose Bacteriana com anti-inflamatório Ibuprofeno para o tratamento de feridas crônicas**. 2017. 123 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.

ZHANG, Pengzi *et al.* Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis. **Annals Of Medicine**, [S.L.], v. 49, n. 2, p. 106-116, 3 nov. 2016. Informa UK Limited.

<http://dx.doi.org/10.1080/07853890.2016.1231932>.

ZHAO, R. *et al.* Inflammation in Chronic Wounds. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 12, p.2085-2099, 11 dez. 2016.

ZHOU, T. *et al.* Electrospun tilapia collagen nanofibers accelerating wound healing via inducing keratinocytes proliferation and differentiation. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 143, p.415-422, jul. 2016.

ANEXO A

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Eficácia da cicatrização em úlceras do pé diabético utilizando membrana de látex natural incorporada com colágeno

Pesquisador: ANA LAURA DESTRO CHAGAS

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 83447618.7.0000.5426

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.807.853

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa intitulado "EFICÁCIA DA CICATRIZAÇÃO EM ÚLCERAS DO PÉ DIABÉTICO UTILIZANDO MEMBRANA DE LÁTEX NATURAL INCORPORADA COM COLÁGENO" necessita de algumas adequações.

Objetivo da Pesquisa:

O trabalho apresenta como objetivo central avaliar a eficácia e segurança do tratamento de lesões de difícil cicatrização, em pé diabético, empregando-se como curativos, membranas de látex associadas ou não à colágeno.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos inerentes a processos alérgicos que possam ser desencadeados pelos componentes do biomaterial, destacando latex e/ou colágeno. Entretanto os pesquisadores destacam que estudos anteriores demonstram segurança e sucesso em estudos in vivo com estes modelos de curativos. Outro risco é de induzir processo inflamatório caso não tenha sido preparados e/ou armazenados em condições estéreis ou assépticas necessárias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta está bem organizada e é de grande relevância para a área.

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1

Bairro: Campus Universitário

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-4657

CEP: 14.801-902

E-mail: sta@fcar.unesp.br

Continuação do Parecer: 2.807.853

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados e estão de acordo com as normas estabelecidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, no uso de suas atribuições, analisou e aprovou ad referendum o projeto de pesquisa em questão.

O Relatórios Parcial deve ser entregues FEVEREIRO de 2019.

O Relatório Final junto aos Termos de Consentimento Livre Esclarecido (originais e assinados em todas as folhas) deverão ser entregues em JULHO de 2019.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1053051.pdf	13/07/2018 17:15:45		Aceito
Cronograma	CRONOGRAMa.pdf	13/07/2018 17:14:16	ANA LAURA DESTRO CHAGAS	Aceito
Outros	respostacep3.pdf	13/07/2018 17:12:29	ANA LAURA DESTRO CHAGAS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO00.pdf	13/07/2018 17:10:53	ANA LAURA DESTRO CHAGAS	Aceito
Outros	parecer.pdf	29/06/2018 10:42:31	Adriano Mondini	Aceito
Outros	Declaracao.pdf	10/04/2018 15:21:26	ANA LAURA DESTRO CHAGAS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	10/04/2018 15:18:02	ANA LAURA DESTRO CHAGAS	Aceito
Outros	smsana.jpg	21/02/2018 23:08:31	ANA LAURA DESTRO CHAGAS	Aceito
Outros	QUESTIONARIO.pdf	21/02/2018 22:50:44	ANA LAURA DESTRO CHAGAS	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	21/02/2018 22:49:29	ANA LAURA DESTRO CHAGAS	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	21/02/2018 22:48:57	ANA LAURA DESTRO CHAGAS	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1

Bairro: Campus Universitário

CEP: 14.801-902

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-4657

E-mail: sta@fcar.unesp.br

Continuação do Parecer: 2.807.853

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 08 de Agosto de 2018

**Assinado por:
Adriano Mondini
(Coordenador)**

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1

Bairro: Campus Universitário

UF: SP

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-902

Telefone: (16)3301-4657

E-mail: sta@fcar.unesp.br

ANEXO B

FORMULÁRIO

Data de preenchimento/...../..... Idade: Sexo:

Raça/cor: Branca • ; Preta • ; Amarela • ; Parda • ; Indígena •

Antecedentes familiares:

Doença vascular: Presença • Ausência • Não Soube Responder • ; HAS: Presença • Ausência • Não Soube Responder • ;

DM: Presença • Ausência • Não Soube Responder • ; AVE: Presença • Ausência • Não Soube Responder • ; IAM: Presença • Ausência • Não Soube Responder • ;

Doença degenerativa: Presença • Ausência • Não Soube Responder • ; qual (ais)-----

Doenças geriátricas: Presença • Ausência • Não Soube Responder • ; qual (ais) -----

Escolaridade: Analfabeto •

Ensino Fundamental: Completo • ; Incompleto • Ensino Médio: Completo • ; Incompleto • Ensino superior: Completo • ; Incompleto •

Boas condições de Moradia • Condições precárias de Moradia •

Condições atuais de saúde:

PA.....mmHg (manhã) mmHg (tarde) IMC.....

Nível de glicose capilar.....mg/dl

Já teve diagnóstico de: Colesterol alto • ; Triglicerídeos alto • ; HDL baixo •

Já realizou teste de DM : Sim • ; Não • ; Não me lembro •

É diabético: Sim • ; Não • ; Não Soube Responder •

Já sofreu AVE: Sim • Não • Não Soube Responder • ;

Possui alguma Sequela física irreversível por traumas: Sim • Não • Não Soube Responder • ; É portador de alguma Doença degenerativa: Sim • Não • Não Soube Responder • ;

qual (ais)-----

É portador de alguma Doença geriátrica: Sim • Não • Não Soube Responder
• ; qual (ais) ----

É portador de alguma doença vascular: Sim • Não • Não soube responder •

Consegue exercer alguma atividade física: SIM • ; NÃO • . Qual
frequência?.....por semana.

Consegue trabalhar? SIM • ; NÃO • ; Sou aposentado(a) •

Há quanto tempo é portador da úlcera: Mês (es) • ; Ano (s) •

Localização da úlcera: membros inferiores- direito • esquerdo • ; região de
trocanter • ; região sacra • ; região isquiática • ; região de calcâneo; Outra • ,
qual (ais).....

Tamanho da úlcera.....cm Profundidade da úlcera.....cm

Tecido presente na úlcera: granulação • ; fibrina• ; necrose

ANEXO C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Senhor(a) você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a), do Projeto de Pesquisa intitulado: Eficácia da cicatrização em úlceras do pé diabético utilizando membrana de látex natural incorporada com colágeno. Meu nome é Ana Laura Destro Chagas, sou a pesquisadora responsável e minha área de atuação é Saúde/Biomedicina, e sou orientada pelo Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizado(a) de forma alguma. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável já citado acima através do telefone (19) 99480 6681, email: ana-laurad@hotmail.com; e com o orientador da pesquisa Profº Drº Rondinelli Donizetti Herculano pelo telefone (16) 3301 4679, e-mail: rond@fcfar.unesp.br ou então com o responsável clínico André Luiz Binotto/CRM: 134755. Em caso de dúvidas sobre a ética aplicada a pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista UNESP de Araraquara pelo telefone: (16) 33301 6897. O trabalho justifica-se pelo elevado número de pessoas portadoras de úlceras do pé diabético e a importância de se pesquisar novas tecnologias seguras ao tratamento destas úlceras.

Esta pesquisa pretende avaliar o impacto que um curativo feito a partir do látex possui sobre sua úlcera de pele, ou úlceras, caso tenha mais que uma. A eficiência do curativo de látex já foi comprovada e está disponível para compra no mercado, mas não está disponível na rede de saúde financiada pelo SUS. Mais recentemente, seu uso junto com extrato natural de barbatimão mostrou ajudar na cicatrização de úlceras, assim estamos interessados em estudar se há outros compostos que também auxiliem na cicatrização.

O objetivo deste estudo é investigar o impacto que o curativo feito a partir do látex junto com o colágeno, que é presente no corpo humano (pele, ossos, tendões etc...), possui sobre as úlceras. Até o momento esta associação foi

estudada em laboratório e demonstrou resultados satisfatórios, sendo esta pesquisa a fase de aplicação direta nas úlceras.

Neste estudo, os participantes serão divididos em dois grupos: receberão curativo de látex ou látex com colágeno após procedimento de limpeza e avaliação clínica pelo enfermeiro.

Sua participação é voluntária, ou seja, só participa da pesquisa se assim desejar. Não haverá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração pela participação na pesquisa. Caso aceite participar, faremos uma entrevista individual, em local reservado, coletando informações de saúde sobre você e sua família. Além disso, também será realizada uma consulta ao seu prontuário (ficha médica), quando necessário para informações adicionais, além de avaliar sua úlcera e agendar data do curativo. Após aceite de participação em pesquisa, serão realizados os curativos periodicamente em datas e horários combinados com você, aplicando o produto de látex ou látex com colágeno.

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são eventos adversos ao produto. Caso apresentar qualquer tipo de reação ao produto aplicado sobre a úlcera, você poderá ligar nos telefones da equipe de pesquisa (veja acima) a qualquer momento, assim, os procedimentos de curativo, avaliação clínica e prescrições cabíveis, incluindo possível retirada de participação da pesquisa, serão tomados. É importante lembrar que você terá suporte de profissionais de saúde capacitados para seu cuidado. Em caso de eventual dano sofrido, o pesquisador responsável fará jus à reparação.

Os potenciais benefícios de sua participação são os curativos e a avaliação clínica rotineiramente, sendo que um dos curativos (látex) já é comprovadamente eficaz para cicatrização de úlceras, enquanto que o outro (composto também por látex, associado ao colágeno, que é uma proteína presente no corpo humano) é potencialmente cicatrizante.

Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo e anonimato, ou seja, ninguém saberá que os dados foram obtidos a partir de você, especificamente. É importante explicar que se você quiser retirar o consentimento de participação, ou seja, se não quiser que seus dados sejam considerados na pesquisa, pode contatar os pesquisadores responsáveis a qualquer momento e cancelar sua participação, independente do motivo e sem prejuízo nenhum para você.

Este termo será assinado em duas vias, das quais uma ficará em posse do pesquisador responsável e a outra com o participante da pesquisa.

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu,

_____, Documento nº _____ () RG ou () CPF, abaixo assinado, concordo em participar deste estudo, como participante.

Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade. Ao final do estudo eu terei acesso aos resultados, como fui informado.

Assinatura do participante de pesquisa

Araraquara, ____ de _____ de _____.

Eu, _____ obtive de forma voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do participante de pesquisa, tendo oferecido tempo suficiente para leitura deste termo, oferecendo explicações sempre que necessário.

Assinatura do pesquisador responsável

Araraquara, ____ de _____ de _____.