UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRO REITORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DOUTORADO

Márcia de Araújo Rebelo

SCAFFOLDS ACELULARES PARA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL E REGENERAÇÃO DO MIOCÁRDIO

Sorocaba/SP
2019

Márcia de Araújo Rebelo

SCAFFOLDS ACELULARES PARA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL E REGENERAÇÃO DO MIOCÁRDIO

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud

Sorocaba/SP

2019

Ficha Catalográfica

Rebelo, Márcia de Araújo

R234s Scaffolds acelulares para recuperação funcional e regeneração do miocárdio / Márcia de Araújo Rebelo. – 2019.

141 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2019.

1. Materiais biomédicos. 2. Engenharia biomédica. 3. Miocárdio – Regeneração. I. Chaud, Marco Vinícius, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título

Márcia de Araújo Rebelo

SCAFFOLDS ACELULARES PARA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL E REGENERAÇÃO DO MIOCÁRDIO

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: ____/____/_____

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marco Vinicius Chaud
Universidade de Sorocaba

Profa. Dra. Priscila Gava Mazzola
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Ângela Faustino Jozzala
PPG – Processos Tecnológicos e Ambiental
Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Norberto Aranha
PPG – Processos Tecnológicos e Ambiental
Universidade de Sorocaba

Profa. Dra. Denise Grotto
Universidade de Sorocaba

Dedico este trabalho à minha família por serem a base de tudo que sou.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por manter a minha fé e ser meu grande companheiro em todos os momentos.

Aos meus pais Acácio e Iraci pelo grande exemplo de caráter, por me ensinarem que devemos manter os nossos princípios, não forjados em religião, mas em exemplos diários de amor e respeito a todos os seres vivos. Agradeço a vocês, meu pais amados, pelo ensinamento de que devemos construir a nossa própria história, conquistando os nossos ideais com humildade e dedicação.

À minha filha Marília por compreender que a busca pelo conhecimento exigia, muitas vezes, a minha ausência. Agradeço a você minha filha, que mesmo sem perceber, foi a grande incentivadora para que eu chegasse até aqui.

Ao meu esposo Roberto pelo amor incondicional e por sempre me apoiar nas minhas escolhas de vida.

Aos meus queridos irmãos Cristina e Luis Carlos, que mesmo indiretamente, sempre me incentivaram e apoiaram.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud por compartilhar comigo o vasto conhecimento e sabedoria que tem.

À Uniso por ter me acolhido durante a graduação e por possibilitar a realização do doutorado.

A todos os colegas pesquisadores do Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia da Uniso (LaBNUS) pela cooperação, apoio e amizade.

A Capes pelo incentivo financeiro.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Estamos aqui para fazer alguma diferença no universo, se não, porque estar aqui?

(Steve Jobs)

RESUMO

A isquemia progressiva e prolongada do músculo cardíaco leva ao infarto agudo do miocárdio (IAM). As mudanças estruturais que ocorrem devido a disfunção do miocárdio faz com que indivíduos acometidos pelo IAM possam evoluir para uma insuficiência cardíaca (IC). Os tratamentos clínicos e farmacológicos apresentam limitações como escassez de doadores e uso indiscriminado de imunossupressores. A implantação de estruturas tridimensionais porosa (*scaffolds*), compostas por biomateriais entram como uma alternativa para regenerar o tecido do miocárdio e recuperar a função contrátil do miocário por apresentarem característica estrutural anisotrópica, propriedades fisiomecânicas e de elasticidade adequada para suportar o estresse mecânico causado pelos movimentos da sístole e diástole, além de favorecer a propagação dos impulsos elétricos gerado pelos cardiomiócitos. O objetivo deste estudo foi projetar, desenvolver e avaliar *in vitro* Scf microparticulado e Scf laminar*,* acelulares, para regeneração e recuperação funcional do músculo cardíaco afetado por isquemia do miocárdio. Para a obtenção dos Scf microparticulados foram preparadas microesferas de alginato de sódio 1,5% (m/v), colágeno tipo I 1,5% (m/v), quitosana 1,5% (m/v) e polianilina (5mg/mL) foram obtidas por geleificação ionotrópica com $CaCl_2$ 5% (m/v). Os Scfs laminares compostos por diferentes proporções de colágeno tipo I 10% (m/v), quitosana 2% (m/v), glicerol 5% e polianilina (5 mg/mL) foram obtidos pelo método de extensão e liofilização. A gelificação ionotrópica possibilitou a incorporação de colágeno tipo I, quitosana e polianilina nas microesferas de alginato de sódio. O diâmetro das microesferas variou entre 160,53 µm a 296,93 µm, com variação de formato esférico e elíptico. As microesferas F6 apresentaram maior capacidade eletrocondutiva. Os resultados de DSC mostraram aumento da energia de entalpia (ΔH) para as formulações congeladas a -8ºC (A3C-110 J/g) e após a incorporação da PANI (DP3UT–147 J/g). Os espectros de FTIR apresentaram sobreposição dos grupamentos OH do glicerol, NH da QT, N-H do ColTipoI e NH evidenciando a ligação entre esses grupamentos. O Scf contendo polianilina (DP3UT) apresentou maior resistência a elongação, flexibilidade e resistência a perfuração. O Scf B3UT apresentou menor módulo de elasticidade. O Scf DP3UT apresentou maior capacidade de mucoadesão após 180s. O Scf D1UT apresentou maior grau de porosidade (77%). O perfil de intumescimento dos Scf variou em função da composição e espessura do Scf. Os Scf de menor espessura apresentaram comportamento de difusão Fickiano e os de maior espessura comportamento anômalo. O Scf B1UT apresentou maior capacidade de absorção. O ensaio de desintegração apresentou maior perda de massa para o Scf D3UT (72%) e menor para o Scf DP3UT (63%). As microesferas produzidas pela técnica de geleificação ionotrópica mostraram diâmetro adequado para serem injetados com agulha (0,23x4mm) na região anterior a lesão isquêmica, Os Scf laminares contendo polianilina apresentaram propriedades fisiomecânicas, de mucoadesão, grau de anisotropia e capacidade de conduzir impulsos elétricos, sendo promissores para a regeneração e recuperação do tecido cardíaco afetado por isquemia prolongada após infarto agudo do miocárdio.

Palavras chaves: *Scaffold*. Bioengenharia reversa. Regeneração do Miocárdio. Microesferas.

ABSTRACT

Progressive and prolonged cardiac muscle ischemia leads to acute myocardial infarction (AMI). The structural changes that occur due to myocardial dysfunction cause individuals affected by AMI to progress cardiac insufficiency (CI). Clinical and pharmacological treatments have limitations such as donor scarcity and the indiscriminate use of immunosuppressants. The implantation of three-dimensional porous structures (scaffolds) composed of biomaterials enter as an alternative to regenerate the myocardial tissue and to recover the contractile function of the myocardium because they present anisotropic structural characteristic, physiological properties and elasticity adequate to withstand the mechanical stress caused by the movements of systole and diastole, besides favoring the propagation of electrical impulses generated by cardiomyocytes. The aim of this study was to design, develop and evaluate in vitro acellular Scf, microparticular and lamellar, for regeneration and functional recuperation of the cardiac muscle affected by myocardial ischemia. Microspheres of 1.5% (m/v) sodium alginate, 1.5% (m/v) type I collagen, 1.5% (m/v) chitosan and polyaniline (5 mg/mL) were obtained by ionotropic gelation with 5% $CaCl_2$ (m/v). Lamellar Scfs composed of different proportions of collagen type I 10% (m/v), chitosan 2% (m/v), 5% glycerol and polyaniline (5 mg/ml) were obtained by the extension and lyophilization method. Ionotropic gelation allowed the incorporation of type I collagen, chitosan and polyaniline in sodium alginate microspheres. The diameter of the microspheres ranged from 160.53 µm to 296.93 µm, with a spherical and elliptical shape variation. F6 microspheres presented higher electroconductive capacity. The DSC results showed increased enthalpy energy (ΔH) for the frozen formulations at -8°C (A3C-110 J/g) and after incorporation of ´polyaniline (DP3UT-147 J/g). The FTIR spectra presented an overlap of the OH groups of the glycerol, NH of the QT, N-H of the ColTipoI and NH evidencing the connection between these groups. Scf containing polyaniline (DP3UT) showed greater resistance to elongation, flexibility and resistance to perforation. The Scf B3UT presented lower modulus of elasticity. Scf DP3UT presented greater mucoadhesion capacity after 180s. Scf D1UT presented higher degree of porosity (77%). The swelling profile of Scf varied according to the composition and thickness of Scf. The lower Scf showed Fickian diffusion behavior and the thicker anomalous behavior. Scf B1UT showed higher absorption capacity. The disintegration test presented greater mass loss for Scf D3UT (72%) and lower for Scf DP3UT (63%). The microspheres produced by the ionotropic gelation technique showed adequate diameter to be injected with a needle (0.23x4mm) in the region anterior to the ischemic lesion. The Scf laminares containing polyaniline presented physiomechanicals and mucoadhesion properties, degree of anisotropy and the ability to conduct electrical impulses, showed promising for the regeneration and functional recuperation of cardiac tissue affected by prolonged ischemia following acute myocardial infarction.

Key words: Scaffold. Reverse Bioengineering. Regeneration of the myocardium. Microspheres.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das principais estruturas anatômicas do coração. 22

Figura 2 - Representação esquemática dos fenômenos envolvidos no infarto agudo do miocárdio....24

Figura 3 - Benefícios apresentados pelo *scaffold* acelular que favorecem a regeneração e recuperação funcional cardíaca 27

Figura 4 - Tipos de aplicação de *scaffolds* acelular para regeneração do tecido cardíaco após infarto agudo do miocárdio. 28

Figura 5 - Representação esquemática da estrutura química do alginato (a) e mecanismo de interação iônica do alginato com cátions divalentes (b) 30

Figura 6 - Representação esquemática da estrutura química da quitina (a), quitosana (b) e quitosana protonada (c) 31

Figura 7 - Representação esquemática da estrutura química do Colágeno tipo I, sendo gly (glicina), pro (prolina) e hyp (hidroxiprolina)....33

Figura 8 - Representação esquemática da estrutura molecular da polianilina na forma reduzida (ganho sw elétrons) e oxidada (perda de elétrons) 35

Figura 9 - Representação esquemática da polianilina na forma de sal de esmeraldina (protonado - cor verde)....35

Figura 10 – Delineamento experimentalo das etapas envolvidas no desenvolvimento dos *scaffolds* acelulares 39

Figura 11 - Sistema de preparação para obtenção de microesferas pelo método de geleificação ionotrópica da dispersão polimérica de alginato de sódio. 41

Figura 12 - Extensor de acrílico com abertura para vazão de 3 mm, 1 cm de largura e 18 cm de comprimento....45

Figura 13 - Extensão da dispersão polimérica sobre placa de vidro com auxílio do extensor de acrílico. 45

Figura 14 - Sistema de intumescimento baseado no Dispositivo de Enslin-Neff utilizado para avaliar a capacidade de intumescimento dos Scf laminares B1C, B1UT, D1C, D1UT, DP1UT e DP3UT. 50

Figura 15 - Curva potenciométrica do colágeno em HCl 25mM (pH 4,5) (A) e NaOH 25 mM (pH 8,0) (B)....52

Figura 16 - Imagem da microscopia óptica das microesferas de alginato de cálcio (F2) após secagem em estufa. Painel (A) solução de CaCl2 a 5% e pH 7,25 e painel (B) solução de CaCl2 a 5% e pH 5,0....53

Figura 17 - DSC das matérias primas AS (A-F), QT (B, D, F), ColTipoI (C, D, F) e PANI (E, F) e microesferas F2 (A-F), F3 (B) F4 (C), F5 (D), F6 (E), F7 (F)....55

Figura 18 - Espectros FTIR do AS e F2 (A) - QT, AS F2 e F3 (B) - AS, ColtTipoI F2 e F4 (C) - AS, ColTipoI, QT, F2 e F5 (D) - AS, PANI, F2 e F6 (E) - AS, ColtTipoI, QT, PANI, F2 e F7 (F) 58

Figura 19 - Imagem fotográfica das microesferas F1- F7 com magnitude de 4x.....60

Figura 20 – Microscopia de varredura eletrônica (MEV) dos microesferas F6 e F7 com magnitude de 200 x (A), 500 x (B) e 2.000 x (C). 64

Figura 21 - Ligações de hidrogênio para formação do crosslinkg entre a quitosana, colágeno tipo I e glicerol. 66

Figura 22 - Imagens fotográficas do Scf Laminar D3UT - (A) Imagem frontal, (B) imagem lateral e (C) Imagem do Scf flexionado. 67

Figura 23 - DSC das matérias primas QT (painéis A-B); ColTipoI (painéis A-B); e Scf laminares A3C, B3C, C3C, D3C (A) e A3UT, B3UT, C3UT e D3UT (B). 69

Figura 24 - Espectros FTIR das matérias primas ColTipoI (painéis A-B); QT (painéis A-B); Glicerol (paineis A-B) e Scf laminares A3C, B3C, C3C, D3C (A) e A3UT, B3UT, C3UT, D3UT (B). 72

Figura 25 - Microscopia de varredura eletrônica (MEV) dos Scfs laminares B1C, D1C (painel I), B1UT e D1UT (painel II). Vista lateral – com magnitude de 100x (A), 200 x (B) e 500 x (C). 84

Figura 26 - Microscopia de varredura eletrônica (MEV) dos Scfs laminares B3C, D3C (painel I) e B3UT e D3UT (painel II). Vista lateral – com magnitude de 100x (A), 200 x (B) e 500 x (C). 85

Figura 27 - Capacidade de Intumescimento dos Scf laminares B1UT - D1UT (A), B3UT – D3UT (B) em PBS pH 7,4. *(n=3)* 88

Figura 28 – Cinética de intumescimento em PBS pH 7,4 dos Scf laminares B1UT (A), D1UT (B), B3UT (C) e D3UT (D) 90

Figura 29 - Ligações de hidrogênio para formação do cross linking entre a quitosana, colágeno tipo I, polianilina e glicerol. 92

Figura 30 - Imagens fotográficas do Scfs dos Laminares D3UT (I) e DP3UT (II) - (A) Imagem frontal, (B) imagem lateral e (C) Imagem do Scf flexionado. 93

Figura 31 - DSC das matérias primas QT; ColTipoI; PANI e Scf laminares D3UT e DP3UT 95

Figura 32 - Espectros FTIR das matérias primas ColTipoI; QT; Glicerol e PANI e Scf laminares D3UT e DP3UT 97

Figura 33- Microscopia de varredura eletrônica (MEV) dos Scfs laminares D1UT, DP1UT (painel I), D3UT e DP3UT (painel II). Vista lateral – com magnitude de 100x (A), 200 x (B) e 500 x (C). 108

Figura 34 - Capacidade de Intumescimento dos Scf laminares D1UT - DP1UT (A), D3UT – DP3UT (B) em PBS pH 7,4. *(n=3)* 110

Figura 35 – Cinética de Intumescimento em PBS pH 7,4 dos Scf laminares D1UT (A), DP1UT (B), D3UT (C) e DP3UT (D) 111

Figura 36 - Perfil de desintegração dos Scf laminares D1UT, DP1UT (A), D3UT e DP3UT (B) em PBS pH 7,4 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Microesferas obtidas com alginato de sódio, quitosana, colágeno tipo I e polianilina 42

Tabela 2 - Formulações das dispersões poliméricas A, B, C e D para preparação de *scaffols* laminares.....44

Tabela 3 - Parâmetros utilizados na avaliação das propriedades fisiomecânicas dos Scf laminares.....47

Tabela 4 - Temperatura referente à perda de água residual, variação de entalpia, cristalização e degradação matérias primas (AS, ColTipoI, QT e PANI) e microesferas F2 - F7 56

Tabela 5 - Diâmetro das microesferas F1 – F7 61

Tabela 6 - Avaliação da capacidade eletrocondutiva das microesferas F6 e F7, *(n=3).* 63

Tabela 7 - Temperatura referente à perda de água residual, variação de entalpia carbonização para matérias primas (ColTipoI e QT) e Scf laminares A3C, A3UT, B3C, B3UT, C3C, C3UT, D3C D3UT. 68

Tabela 8 - Propriedades fisiomecânicas e elasticidade dos Scf laminares A1 (C-UT), B1 (C-UT), C1 (C-UT) e D1 (C-UT), , *(n=3).*.....74

Tabela 9 - Propriedades fisiomecânicas e elasticidade dos Scf laminares A3 (C-UT), B3 (C-UT), C3 (C-UT) e D3 (C-UT), *(n=3).*.....74

Tabela 10 – Capacidade de mucoadesão dos Scfs laminares A1 (C-UT), B1 (C-UT), C1 (C-UT) e D1 (C-UT), *(n=3).*.....78

Tabela 11 – Capacidade de mucoadesão dos Scfs laminares A3 (C-UT), B3 (C-UT), C3 (C-UT) e D3 (C-UT) *(n=3)*.....79

Tabela 12 - Descrição da porosidade (%), poros fechados (%), volume de poros abertos (mm^3) e grau de anisotropia dos Scf laminares B1C, D1C. B1UT e D1UT ..81

Tabela 13 - Descrição da porosidade (%), poros fechados (%), volume de poros abertos ($mm-^3$) e grau de anisotropia dos Scf laminares B3C, D3C. B3UT e D3UT .82

Tabela 14 - Variação do diâmetro dos poros obtidos por MEV dos Scf B1C, B1UT, B3C, B3UT, D1C, D1UT, D3C e D3UT 86

Tabela 15 - Temperatura referente à perda de água residual, variação de entalpia carbonização para matérias primas (QT, ColtipoI e PANI) e Scf laminares D3UT e DP3UT. 94

Tabela 16 - Avaliação da capacidade de condutividade do impulso elétrico dos Scf laminares D1UT, DP1UT, D3UT E DP3UT, *(n=3).*.....98

Tabela 17 - Propriedades fisiomecânicas e elasticidade dos Scf laminares D1UT, DP1UT, D3UT e DP3UT. *(n=3).*.....100

Tabela 18 - A capacidade de mucoadesão apresentadas pelos Scf laminares D1UT, DP1UT, D3UT e DP3UT. *(n=3)*.....104

Tabela 19 - Descrição da porosidade (%), poros fechados (%), volume de poros abertos (mm^{-3}) e grau de anisotropia dos Scf laminares D1UT, DP1UT, D3UT e DP3UT 106

Tabela 20 - Variação do tamanho dos poros dos Scf D1UT, DP1UT, D3UT e DP3UT 109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%: Porcentagem

∆H: Ponto de fusão

<: Menor que

>: Maior que

®: Marca registrada

°C: Grau Celsius

µ: Micro

µL: Microlitro

µm: Micrômetro

3D: Três dimensões

AC: Alginato de cálcio

AL: Alginato

Al^{3+}: Íons de alumínio

AS: Alginato de Sócio

C: Congelador

C=C: Grupamento carbonila

Ca^{2+}: Íon cálcio

$CaCl_2$: Cloreto de cálcio

CH: Grupamento metil

cm: Centímetro

$cm^{2:}$ Centímetro quadrado

cm^3: Centímetro cúbico

ColTipoI: Colágeno tipo I

COO-: Grupamento carboxílico

DCV: Distúrbio cardiovascular

DSC: Calorimetria diferencial exploratória

eV: Eletron volts

Fmáx: Força máxima

FTIR: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

G: Glicerol

g: Grama

G: Gulurônicos

GlcN: 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranose

GlcNAc: 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranose

Gly: Glicina

H: Hidrogênio

h: Hora

H_2O: Água

HCl: Ácido clorídrico

IAM: Infarto agudo do miocárdio

IC: Insuficiência cardíaca

KBr: Brometo de potássio

KPa: Quilopascal

kV: Quilo volts

M: Manurônicos

M: Molar

mA: Miliàmpere

MEC: Matriz extracelular

MEV: Microscopia de varredura eletrônica

mg: Miligrama

Mg^{2+}: Íon magnésio

min: Minuto

mL: Mililitro

mm/s: Milímetro por segundo

MM: Massa molecular

MM: Massa molecular

$mm^{3:}$ Milímetro cúbico

mmm: Média massa molecular

MPa: Mega Pascal

mv : Média viscosidade

N: Normalidade

Na^{+}: Íon sódio

NaCl: Cloreto de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

NH_2: Grupamento amina

$NH_3^{+:}$ Grupamento amino protonado

nm: Nanômetro

OH: Hidroxila

PANI: Polianilina

PBS: Solução Tampão Fosfato

PC: Polímero condutor

pH: Potencial hidrogeniônico

QT: Quitosana

rpm: Rotações por minuto

S/cm: Siemens por centímetro

Scf: *Scaffold*

Tg: Transição vítrea

UT: Ultrafreezer

v/m: Volume/massa

v/v: Volume/volume

VE: Ventrículo esquerdo

µCT: Microtomografia computadorizada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20
2 REVISÃO DA LITERAtURA 22
2.1 TECIDO CARDÍACO 22
2.2 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM) 23
***2.3 SCAFFOLD* 25**
2.4 BIOMATERIAL 29
2.4.1 ALGINATO 29
2.4.2 QUITOSANA 31
2.4.3 COLÁGENO 32
2.4.4 POLIANILINA 34
3 OBJETIVOS 37
3.1 GERAL: 37
3.1.1 *SCAFFOLD* MICROPARTICULADO 37
3.1.2 *SCAFFOLD* LAMINAR 37
4 MATERIAL E MÉTODO 38
4.1 MATERIAL 38
4.2 MÉTODO 38
4.3 DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DO COLÁGENO TIPO I 40
4.4 PREPARAÇÃO DA POLIANILINA 40
4.5 PREPARAÇÃO DO *SCAFFOLDS* ACELULARES 40
4.5.1 PREPARAÇÃO DO *SCAFFOLD* MICROPARTICULADO 40
4.5.2 PREPARAÇÃO DOS *SCAFFOLD* LAMINARES 43
4.6 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO 46
4.6.1 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS MICROESFERAS 46
4.6.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) 46
4.6.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) 46
4.6.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE CONDUTIVIDADE DO IMPULSO ELÉTRICO 47
4.6.5 PROPRIEDADES FISIOMECÂNICAS E DE MUCOADESÃO DOS SCF LAMINARES 47
4.6.6 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μCT) DOS SCF LAMINARES 49
4.6.7 MICROSCOPIA DE VARREDURA ELETRÔNICA (MEV) 49
4.6.8 CAPACIDADE DE INTUMESCIMENTO DOS *SCAFFOLDS* LAMINARES 49
4.6.9 AVALIAÇÃO DA DESINTEGRAÇÃO *IN VITRO* PELO MÉTODO DE IMERSÃO 50

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 51
4.8 SELEÇÃO DAS MELHORES AMOSTRAS DE MICROESFERAS E SCF LAMINAR 51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 52
5.1 CARACTERIZAÇÃO DE MATÉRIA PRIMA 52
5.1.1 PONTO ISOELÉTRICO DO COLÁGENO TIPO I (COLTIPOI) 52
5.2 *SCAFFOLD* MICROPARTICULADO 53
5.2.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ENVOLVIDOS NA PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS ..53
5.2.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) 55
5.2.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .57
5.2.4 AVALIAÇÃO DO ASPECTO MORFOLÓGICO DAS ESFERAS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA 60
5.2.5 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS 62
5.2.6 CAPACIDADE DE CONDUTIVIDADE DO IMPULSO ELÉTRICO 62
5.2.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MICROESFERAS ELETROCONDUTIVAS 63
5.3 *SCAFFOLD* LAMINAR 65
5.3.1 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS 66
5.3.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) 68
5.3.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) ..71
5.3.4 PROPRIEDADES FISIOMECÂNICAS E MÓDULO DE ELASTICIDADE 73
5.3.5 CAPACIDADE DE MUCOADESÃO 78
5.3.6 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS 80
5.3.7 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μCT) 81
5.3.8 MICROSCOPIA DE VARREDURA ELETRÔNICA (MEV) 84
5.3.9 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS 87
5.3.10 CAPACIDADE DE INTUMESCIMENTO 87
5.4 *SCAFFOLD* LAMINAR COM CAPACIDADE ELETROCONDUTIVA 91
5.4.1 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS 92
5.4.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) 94
5.4.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) ..97
5.4.4 CAPACIDADE DE CONDUTIVIDADE DO IMPULSO ELÉTRICO 98
5.4.5 PROPRIEDADES FISIOMECÂNICAS E MÓDULO DE ELASTICIDADE 100
5.4.6 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μCT) 105

5.4.7 MICROSCOPIA DE VARREDURA ELETRÔNICA (MEV).....107
5.4.8 CAPACIDADE DE INTUMESCIMENTO.....109
5.4.9 DESINTEGRAÇÃO *IN VITRO* PELO MÉTODO DE IMERSÃO.....112

6 CONCLUSÃO.....115

REFERÊNCIAS.....116

APÊNDICE A – Produção Científica no período de 2016 - 2019**.....116**

APÊNDICE B – Colaboração em Produção Científica no período de 2016 – 2019**.....133**

1 INTRODUÇÃO

A isquemia progressiva e prolongada do músculo cardíaco leva ao infarto agudo do miocárdio (IAM). O tratamento clínico para o IAM tem como objetivo restaurar a perfusão precoce do segmento do músculo cardíaco atingido e melhorar a integridade funcional do coração. No entanto, quando a reperfusão não é realizada a tempo, ocorre uma sequência de reações fisiológicas iniciadas pela apoptose dos cardiomiócitos e enfraquecimento da matriz extracelular, aumento do volume ventricular, remodelação do miocárdio, formação de tecido cicatricial (fibrose) e perda da capacidade contrátil. A perda da função contrátil na região infartada leva a uma readaptação compensatória e aumento da pressão diastólica no ventrículo esquerdo (VE). As mudanças estruturais que ocorrem devido a disfunção do miocárdio fazem com que indivíduos acometidos pelo IAM possam evoluir para uma insuficiência cardíaca (IC). Em decorrência da IC, o indivíduo começa a apresentar dispneia progressiva a esforço físico, e arritmias ventriculares graves, diminuindo a expectativa de vida.

Tratamentos clínicos e farmacológicos são alternativas utilizadas para evitar que pacientes com IC cheguem a óbito. Outra alternativa, é a realização de transplante de coração, porém a escassez de doadores e o uso indiscriminado de imunossupressores é um limitante para o sucesso dessa terapia.

A medicina regenerativa surge como uma alternativa para superar as limitações dos tratamentos tradicionais para pacientes acometidos pela IAM contribuindo para evitar que ocorra a evolução para IC. A implantação de estruturas tridimensionais porosas (*scaffolds*), compostas por biomateriais, apresentam propriedades fisiomecânicas e químicas que mimetizam o tecido nativo favorecendo a adesão, proliferação e diferenciação celular.

A característica biomimética dos *scaffolds* (Scfs) pode favorecer a regeneração tecidual. No entanto, o tecido cardíaco apresenta uma constituição complexa, além de ser constantemente exposto a estresse mecânico cíclico responsável pela sístole e diástole. Essa capacidade de extensão elástica e relaxamento, estimuladas por impulsos elétricos, é um desafio ao se projetar Scfs para regeneração do tecido muscular cardíaco.

A utilização de biomateriais que mimetizem a matriz extracelular (MEC) e que apresentem a capacidade de propagar os impulsos elétricos no decorrer de sua estrutura pode ser uma alternativa para superar as dificuldades apresentadas pelos tratamentos clínicos e farmacológicos.

Polímeros naturais como o colágeno Tipo I (ColTipoI), por ser uma proteína predominante na MEC, tem sido utilizado em Scf para regeneração cardíaca. No entanto, a baixa resistência mecânica deste biomaterial limita sua aplicação como único constituinte de Scf.

Diante do exposto, propomos neste estudo o desenvolvimento de Scf acelular microparticulado e na forma laminar como uma alternativa para a regeneração do tecido cardíaco.

Para o Scf laminar o uso de biomateriais como o ColTipoI associado à quitosana (QT) foi utilizado para mimetizar a MEC cardíaca, favorecer a adesão celular e aumentar a resistência mecânica. Para melhorar a característica elástica da estrutura foi testado a inclusão do glicerol como agente plastificante e reticulante.

O Scf microparticulado foi projetado na forma de microesferas para ser injetado na região anterior da lesão tecidual. O alginato de sódio (AS) devido a sua capacidade de reticular em presença de cátions polivalentes é muito utilizado para a formação de esferas e contribui para reforçar a MEC. A incorporação do ColTipoI e da QT desacetilada em uma estrutura semelhante à MEC estimula a migração e adesão celular na superfície das microesferas. O impulso elétrico, necessária para a diferenciação dos cardiomiócitos foi beneficiado pela incorporação da polianilina, polímero condutor, no Scf microparticulado e Scf laminar.

Os desafios científicos e tecnológicos apresentados por este estudo com o objetivo de favorecer a regeneração e recuperação funcional do miocárdio são: i – determinar a proporção ideal dos biomateriais capazes de mimetizar o microambiente do tecido do miocárdio, ii) determinar os parâmetros ideais para a formação de microesferas poliméricas para aplicação injetável e formação do Scf microparticulado e iii) determinar os parâmetros ideais para a formação de estrutura laminar com porosidade, resistência fisiomecânica, desintegração e condução do impulso elétrico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

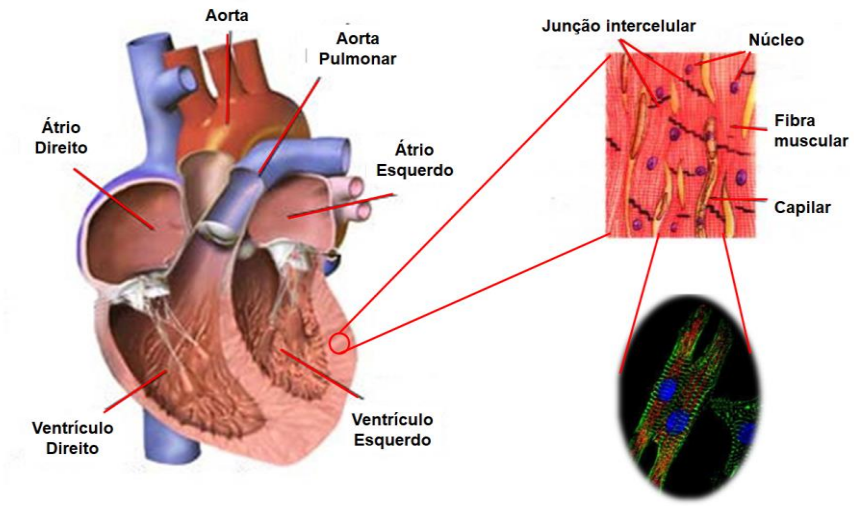
2.1 Tecido cardíaco

O músculo cardíaco é constituído por cardiomiócitos com tamanho que varia de 10-40 µm de diâmetro e 50-200 µm de comprimento. Nas extremidades dos cardiomiócitos, observam-se junções intercelulares complexas (junções *gap*) que possibilitam o fluxo de corrente elétrica na forma de íons. A característica excitável do coração permite a propagação do potencial de ação responsável pelo funcionamento coordenado do tecido cardíaco. O músculo cardíaco apresenta ainda linhas transversais responsáveis pela força de contração e velocidade de propagação do impulso cardíaco (Figura 1). O circuito elétrico do coração segue um caminho distinto do átrio direito através dos ventrículos do coração (IAIZZO, 2005; IVER et al., 2012; SHIELS, 2017).

Além dos cardiomiócitos o tecido cardíaco é constituído por células como fibroblastos, células musculares lisas e endoteliais que variam em alinhamento, distribuição populacional e fenótipos entre as diferentes regiões do coração (XIN; OLSON; BASSEL-DUBY, 2013).

A matriz extracelular (MEC) cardíaca é composta por colágeno tipo I e tipo III que acoplam cardiomiócitos e mantêm o arranjo espacial entre os miofilamentos e os capilares locais (KORECKY; HAI; RAKUSAN, 1982; TILKORN et al., 2010, CHRISTINE et al., 2016).

Figura 1 - Representação esquemática das principais estruturas anatômicas do coração.



Fonte: Adaptado de https://www.todamateria.com.br/coracao

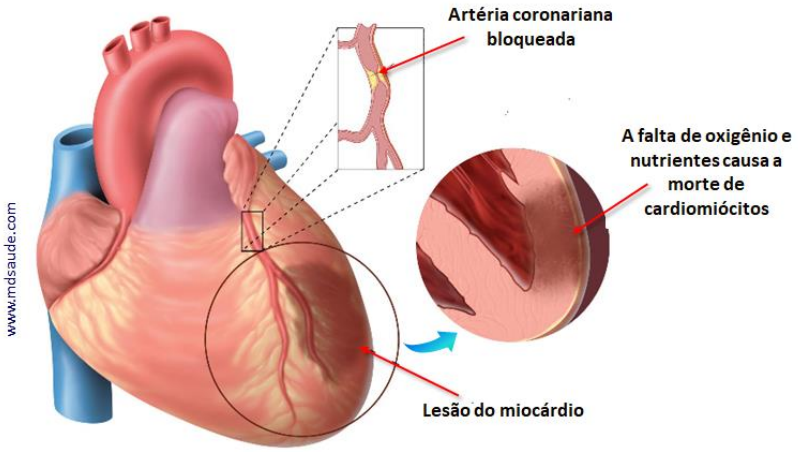
O músculo cardíaco possui propriedades eletrofisiológicas e mecânicas que determinam o funcionamento automático e cíclico do órgão. As propriedades eletrofisiológicas e mecânicas são responsáveis pela contratilidade e relaxamento do músculo cardíaco (AGGARWAL; MAKIELSKI, 2013; SHIELS, 2017). Contratilidade é a capacidade de contração do músculo cardíaco, chamado de sístole. A atividade mecânica de contração está associada à excitação elétrica dos cardiomiócitos. A estimulação da célula cardíaca permite a propagação do potencial de ação para as células vizinhas através das junções *gap,* contraindo o músculo cardíaco e bombeando o sangue. Relaxamento é a capacidade de desativação do coração, chamado de diástole, responsável pelo retorno do sangue e o enchimento do coração (IAIZZO, 2005; VIKHOREV, 2018).

2.2 Infarto Agudo do Miocárdio (IAM)

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo (HUANG et al., 2018). Segundo a Organização Mundial de saúde (OMS) em 2016 cerca de 17,9 milhões de pessoas morreram devido a DCV, sendo que dentre estas mortes 85% é decorrente de derrame e infarto agudo do miocárdio (IAM) (ASARIA et al., 2017).

O termo IAM pode ser definido como a morte de cardiomiócitos causada por isquemia prolongada. Na maioria dos casos de IAM, ocorre uma interrupção aguda do fluxo de sangue em um ramo coronariano que compromete a viabilidade ou a capacidade contrátil desse tecido muscular (Figura 2). O tratamento clínico para o IAM tem como objetivo restaurar a perfusão precoce do segmento do músculo cardíaco atingido e melhorar a integridade funcional do coração (DAVIES, 2000; FATHALA, 2011).

Figura 2 - Representação esquemática dos fenômenos envolvidos no infarto agudo do miocárdio



Fonte: adaptado de www.mdsaude.com

A angioplastia primária é a terapia que apresenta maior índice de sucesso, pois leva à revascularização de 90 a 95% do tecido afetado (TING; YANG; RIHAL, 2016). A recanalização precoce da artéria responsável pelo infarto limita a fibrose miocárdica e reduz tanto a morbidade como a mortalidade. No entanto, para alcançar este índice de recuperação, o fluxo coronariano deve ser restabelecido no período de 60 a 90 min da ocorrência do IAM (PIEGAS, 2015). Quando a reperfusão não é realizada a tempo, o miocárdio pode sofrer diferentes graus de lesão e rompimento das fibras musculares e das redes de colágeno. O quadro pode evoluir para um alto grau de morte celular, seguido por necrose da área comprometida e perda da elasticidade miocárdica e ação de bombeamento sanguíneo (VAUGHAN; PFEFFER, 1994 ;PARK et al., 2011).

Após o IAM ocorre uma sequência de reações fisiológicas iniciadas com a apoptose dos cardiomiócitos (PIEGAS et al., 2015). Dependendo da idade do indivíduo o miocárdio apresenta uma taxa de reposição dos cardiomiócitos estimada entre 0,3 a 1%, anualmente (BERGMANN et al., 2010). No entanto, o coração humano não pode regenerar a função contrátil após o IAM, pois os cardiomiócitos são diferenciados e não se proliferam na região com isquemia tecidual. A não reposição dos cardiomiócitos leva à formação de uma cicatriz colagenosa que interfere na sístole e diástole, função natural do músculo cardíaco (SOONPAA; FIELD, 1998; NADAL-GINARD; ANVERSA; LERI, 2003; LEOR; AMSALEM; COHEN, 2005).

Em decorrência ao insulto isquêmico instalado, ocorre a readaptação e compensação do segmento não mais contrátil do coração, resultando no remodelamento ventricular (FRANCIS, 2001). Durante o processo de remodelamento, ocorrem mudanças estruturais na região cardíaca afetada pela isquemia, causando o aumento da pressão diastólica no VE. Os pacientes acometidos por disfunção do miocárdio tendem a apresentar sintomas progressivos de IC, como dispneia progressiva a esforços e arritmias ventriculares graves, gerando alto custo de tratamento e diminuição da expectativa de vida (VAUGHAN; PFEFFER, 1994; COHN et al., 2000; PIEGAS, 2015).

Apesar dos benefícios dos tratamentos clínicos e farmacológicos do IAM, a ocorrência de IC, como patologia compensatória, é significativa e responsável pela maioria dos óbitos. No caso de paciente com IC em fase terminal, o transplante cardíaco se torna a alternativa mais viável (XING et al., 2012). No entanto, os procedimentos cirúrgicos com esta finalidade enfrentam obstáculos que limitam sua aplicação. Entre as dificuldades encontra-se a escassez de doadores, os dispositivos biomédicos pouco eficientes e uso indiscriminado de imunossupressores para evitar rejeição do tecido ou órgão implantado (TABATA, 2009; LAM; WU, 2012).

O uso de medicina regenerativa surge como uma nova abordagem para facilitar o reparo do tecido cardíaco isquêmico, após o IAM. Produtos da engenharia de tecidos como as estruturas tridimensionais biomiméticas (*scaffolds*), podem prover uma alternativa tecnológica para superar as limitações causadas pelas doenças cardiovasculares, em especial o IAM. Os scaffolds (Scfs) podem substituir a parte afetada do coração, induzir ou ampliar a regeneração endógena da área fibrosada do tecido cardíaco (SERPOOSHAN et al., 2014), diminuindo a necessidade de transplantes (LAM; WU, 2012; TABATA, 2009; GUIMARÃES et al., 2016).

2.3 Scaffold

Scaffold (Scf) são matrizes tridimensionais porosas e temporárias capazes de mimetizar a MEC e estimular respostas celulares específicas em nível molecular. Este modelo de dispositivo biomédico fornece condições biofísicas e bioquímicas adequadas, tanto para propagação celular e/ou molecular de sinalização específica, como para manter-se integrado ao tecido hospedeiro, sem risco de rejeição (PARK et al., 2011; REBELO et al., 2015).

Scfs devem preencher requisitos biológicos, químicos e arquitetônicos específicos de forma a biomimetizar a MEC do tecido nativo e estimular os processos regenerativos. Dentre esses requisitos podemos citar: (i) biocompatibilidade, integrar-se ao tecido nativo provocando resposta imunológica mínima; (ii) taxa de biodegradação compatível com a taxa de regeneração do novo tecido, de modo que o Scf esteja totalmente degradado após a regeneração tecidual; (iii) propriedades fisiomecânicas similares as do tecido hospedeiro, para que possa suportar a pressão hidrostática e manter os espaços necessários para a proliferação celular e formação da nova MEC; (iv) poros uniformes, interligados e com tamanhos adequados ao fenótipo celular do tecido afetado e para permitir o transporte de nutrientes e metabólitos; possuir propriedades de superfície (química e topográfica) adequadas de modo a permitir a adesão e proliferação celular (SALGADO; COUTINHO; REIS, 2004; SUÀREZ-GONZÀLEZ et al., 2010; KHORSHIDI et al., 2016).

Na engenharia de tecidos os métodos mais utilizados para preparar Scfs incluem: “solid free-form fabrication”, modificações nos métodos “particle leaching”, “gas foaming”, “termal induced phase separation”, “eletrospining”, “freeze-drying unidirecional” e “biopoloting” (MULDER; BUMA; HANNINK, 2009*;* CHRISTINE et al., 2016).

Scfs podem ser celulares ou acelulares. Nos Scfs celulares as células são incorporadas na estrutura antes da implantação do dispositivo no tecido cardiaco (KLEIN et al., 2009). Os Scfs acelulares, por sua vez, são compósitos que utilizam um ou mais biomateriais presentes na MEC, como as proteínas (colágeno) e glicosaminoglicanas (polissacarídeos), para estimular a quimiotaxia dos complexos celulares/moleculares, como fatores de crescimento e iniciar a regeneração tecidual específic (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011; ALEGRIA et al., 2018). A Figura 3 mostra os benefícios do Scf acelular na regeneração cardíaca.

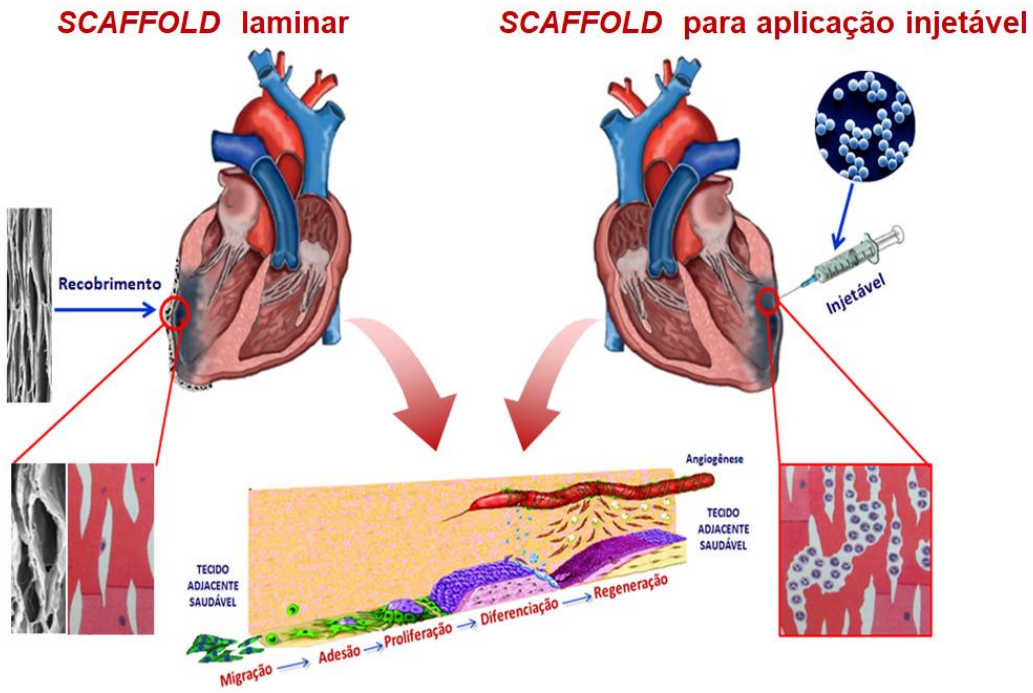
Figura 3 - Benefícios apresentados pelo *scaffold* acelular que favorecem a regeneração e recuperação funcional cardíaca

Fonte: Elaboração Própria

Um dos problemas apresentado pelos Scfs celulares é que os batimentos cardíacos estimulam a migração das células incorporadas na estrutura para os tecidos adjacentes, chegando muitas vezes à corrente sanguínea. A baixa taxa de retenção celular compromete, a médio e longo prazo, a proliferação e regeneração do tecido lesionado (LANE, 2007; DOMENECH et al., 2016). Diante dessa limitação Scf acelulares são uma alternativa promissora para a regeneração tecidual, pois apresentam a capacidade de se integrar ao tecido nativo e promover a migração de células nativas para o interior de sua estrutura. Outras vantagens é que os Scfs acelulares apresentam disponibilidade imediata de estruturas já comercializadas, como por exemplo, SynerGraft®, AlloDerm®, DermaMatrix®; baixa reação imunológica e baixo custo (DOMENECH et al., 2016).

Scfs acelulares podem ser implantados ou injetados na região lesionada com o objetivo de estimular a migração de células endógenas, proliferação celular e função específica (Figura 4). Diferentes tipos de Scf para regeneração de tecidos estão disponíveis: (i) matriz porosa tridimensional (BARDAKOVA et al., 2019) (ii) matriz nanofibrosa (MING; ZUO, 2012), (iii) hidrogéis termorresponsivo (AVILÉS; SHEA, 2011), (iv) *scaffold* microparticulado (baseado em microesferas) (SHALUMON et al., 2016) e (v) matriz laminar (MANDAL et al., 2013).

Figura 4 - Tipos de aplicação de *scaffolds* acelular para regeneração do tecido cardíaco após infarto agudo do miocárdio.



Fonte: adaptado de www.mdsaude.com

Scf laminar quando implantado na região lesionada pode se ligar aos fibroblastos do tecido cardíaco e bloquear a geração de forças contráteis que favorecem o aumento da lesão cardíaca. O bloqueio da contração parece beneficiar a regeneração no tecido que foi lesionado (ANNAS; ZERANIS; ARLEY, 2010). Cabe ressaltar que na fase aguda a dilatação ventricular é consequência do processo de expansão do IAM, enquanto que a dilatação cavitária tardia é consequência do processo de hipertrofia excêntrica (ZORNOFF et al., 2008) (REBELO et al., 2015; YE; BLACK, 2011; SICARI vvvet al., 2014).

Scf injetáveis, na forma microparticulada, são de interesse no campo da medicina regenerativa devido à sua aplicação minimamente invasiva e capacidade de preencher qualquer tamanho ou forma. As propriedades microestruturais dos Scf baseados em microesferas favorecem a reparação tecidual devido aos altos níveis de porosidade e diâmetro dos poros, propriedades necessárias para que ocorra a migração, adesão e proliferação celular, além de contribuir para o fornecimento de nutrientes e eliminação de metabólitos (QUTACHI et al., 2014).

Scf injetáveis baseados em microesferas podem possuir propriedades estruturais superiores a outros sistemas injetáveis, tais como hidrogéis ou pastas

(WANG et al., 2012). Uma variedade de polímeros, naturais e sintéticos, como colágeno, quitosana, alginato e poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), tem sido usado para fabricar Scf injetáveis baseados em microesferas para regeneração de tecido ósseo, hepático, cardíaco e cartilaginoso (MUNARIN; COULOMBE, 2015; (GUPTA et al., 2017).

O momento mais adequado para usar a terapia com base em Scf é após a ocorrência do IAM. A implantação do Scf na área recém infartada poderá mimetizar a MEC nativa, levando a ativação de fatores quimiotáticos, recrutamento de cardiomiócitos funcionais, estimulação da proliferação celular e subsequente regeneração tecidual. Outra hipótese é que o Scf poderá fornecer reforço mecânico adequado reduzindo o impacto do IAM na dilatação do VE, remodelamento ventricular e diminuindo a formação de fibrose (ANNAS; ZERANIS; ARLEY, 2010; YE; BLACK, 2011; REBELO et al., 2015; STOPPEL et al., 2015).

Cabe ressaltar que a regeneração tecidual é favorecida pelo uso de materiais com características biomiméticas, como os biomateriais, que devido as suas propriedades fisiomecânicas, químicas e biocompatíveis, juntamente com o método de preparação do Scf, favorecem a formação de uma estrutura que estimula a migração, adesão e proliferação celular (TABATA, 2009; SUÀREZ-GONZÀLEZ et al., 2010).

2.4 Biomaterial

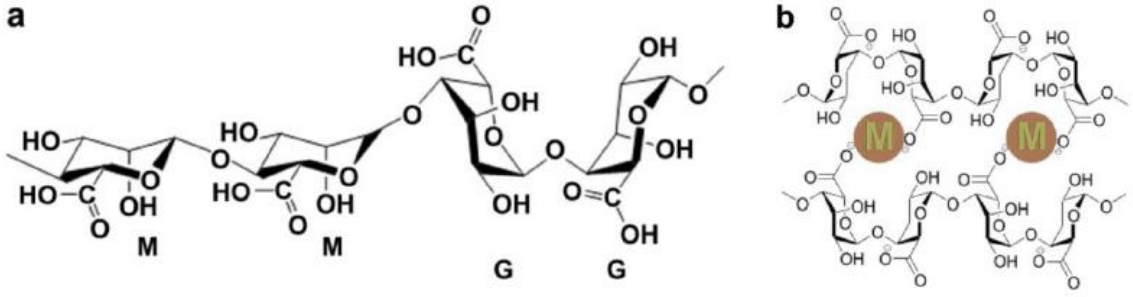
O termo biomaterial refere-se a todo material sintético ou natural que, juntamente com as células constitui toda ou parte de um dispositivo biomédico capaz de substituir ou melhorar uma função natural sem causar qualquer reação tóxica nem rejeição imunológica (BHAT; KUMAR, 2013).

2.4.1 Alginato

O alginato (AL) é um copolímero aniônico linear (Figura 5a) constituído de ácidos α-L-gulurônicos e β-D-manurônicos com ligações 1-4. O material varia extensamente em termos da proporção de resíduos manurônicos (M) e gulurônicos (G), bem como na estrutura sequencial e grau de polimerização. Desta forma, o material pode apresentar sequências alternadas de resíduos M-G (blocos constituídos de dois ou mais resíduos M ou G) (PURCELL; SINGH; KIPKE, 2009; LEE; MOONEY, 2012).

A geleificação ionotrópica é o processo utilizado para se obter hidrogel de AL. Íons bivalentes, como Ca^{2+} ou Mg^{2+}, quando entram em contato com a dispersão de alginato de sódio, provocam a dissociação do sódio, que migra para a solução de eletrólito. Em contrapartida, os íons de Ca^{2+}, devido à carga bivalente irão se ligar aos blocos G disponíveis no interior da cadeia, formando uma estrutura tridimensional descrita como modelo “caixa de ovos” (Figura 5b). A concentração de Ca^{2+} utilizada influencia a associação intercadeias, podendo ser temporária ou permanente, sendo que concentrações altas de Ca^{2+} favorecem a associação permanente (GEORGE; ABRAHAM, 2006; LEE; MOONEY, 2012).

Figura 5 - Representação esquemática da estrutura química do alginato (a) e mecanismo de interação iônica do alginato com cátions divalentes (b)



Fonte: (TAN, 2013)

Uniformidade e resistência do hidrogel de AL dependem da taxa de geleificação, sendo que a geleificação lenta favorece essas propriedades. Outro parâmetro importante na geleificação é a temperatura, temperaturas mais baixas retardam a formação de ligações cruzadas no hidrogel de AL (KUO; MA, 2001; DRURY, DENNIS; MOONEY, 2004);

A massa molar (MM) do AL influência na taxa de degradação e propriedades mecânicas, os grupamentos químicos disponíveis irão influenciar a taxa de degradação por hidrólise e as propriedades mecânicas devido a suas propriedades estruturais (SUN; TAN, 2013).

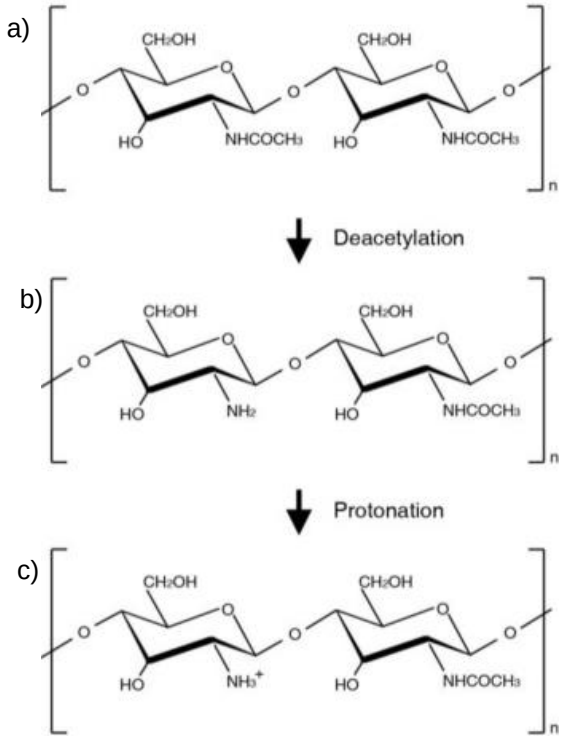
Esferas de alginato são obtidas pela reticulação iônica na presença de Ca^{2+} e são utilizadas para encapsular substâncias bioativas como fatores de crescimento e proteínas, conforme vai ocorrendo à degradação hidrolítica, essas substâncias vão sendo liberadas (CHANG, 1998; MAN et al., 2012). Além disso, o AL pode ser utilizado para formar Scf de várias formas (esferas, esponjas, fibras e bastões) para

aplicações na medicina regenerativa. As esferas de AL podem se organizar em estruturas tridimensionais (Scf) formando poros interconectados. A permeabilidade apresentada pelas esferas favorece a proteção imunológica a muitas células, permitindo a adesão, proliferação e diferenciação celular (WANG et al., 2011; SUN; TAN, 2013).

2.4.2 Quitosana

Quitosana (QT) é um biopolímero hidrofílico obtido a partir da quitina (Figura 6a). (SENEL; MCCLURE, 2004). A molécula de QT (Figura 6b) é constituída de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranose (GlcN) unidas pelo mesmo tipo de ligação glicosídica β(1→4). A proporção das duas unidades na QT depende do tratamento alcalino do processo de extração. No estado sólido, a QT é um polímero semicristalino, que na difração de raio-X apresenta três tipos de cristais: α , β e γ (RAVI KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006).

Figura 6 - Representação esquemática da estrutura química da quitina (a), quitosana (b) e quitosana protonada (c)



Fonte: (YANG, 2011)

A QT é uma base fraca insolúvel em água e solução fisiológica e solúvel em soluções ácida (pH inferior a 6). Devido a presença das unidades glucosamina, ao

serem diluídas em ácido acético, ocorre a protonoção dos grupamentos amino (NH_3^+) (Figura 6c), formando um polímero de característica catiônica. O processo de protonação enfraquece a resistência mecânica e química do hidrogel, mas favorece o grau de intumescimento e usa interação com outros polímeros de característica catiônica (ZHANG et al., 2010; DASH et al., 2011; AVILÉS; SHEA, 2011).

Os grupamentos amino (NH_2) presentes na estrutura da QT confere características de bioadesão (PERIOLI et al., 2008) e a similaridade entre a estrutura química da QT e do ácido hialurônico reforça a indicação do uso deste biopolímero na área biomédica. Compostos contendo QT favorece seu uso como agente cicatrizante e reparador de tecidos, pois é capaz de aumentar as funções de células inflamatórias como os leucócitos polimorfonucleares e macrófagos (UENO et al., 2001; ZHANG et al., 2010; DASH et al., 2011).

Compósitos à base de QT podem combinar várias propriedades de interesse para a engenharia de tecidos cardíacos, incluindo a origem natural e a biodegradabilidade (como estruturas de colágeno) com propriedades mecânicas e condução elétrica adequadas. Como a QT é não condutiva, suas propriedades elétricas podem ser melhoradas pela adição de material condutor (MARTINS et al., 2014). Scf compostos por QT e/ou colágeno permitem um melhor controle das propriedades mecânicas e podem ser bons promotores de angiogêneses para o tecido cardíaco (STOPPEL et al., 2015).

2.4.3 Colágeno

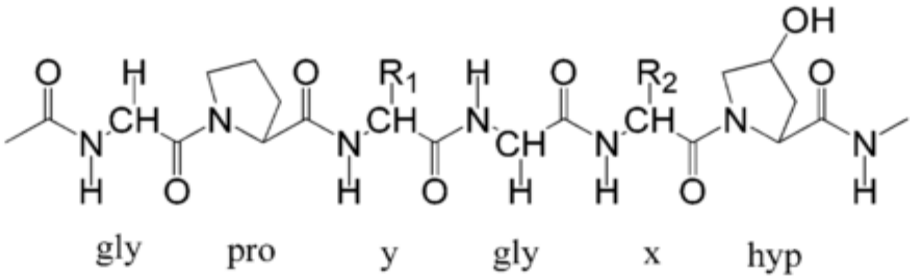
As proteínas como o colágeno são formadas pela polimerização de uma mistura de aminoácidos por meio de ligações peptídicas (-CO-NH-), resultando em cadeias longas com seus respectivos grupos laterais (R1, R2, etc.). Existem mais de 20 tipos de colágeno e todos apresentam a mesma estrutura molecular básica, ou seja, uma tripla hélice formada por cadeias peptídicas de aminoácidos (Gly-X-Y). A glicina (Gly) corresponde a um terço dos aminoácidos, outros 15 a 30% correspondem a prolina (Pro na posição X) e a hidroxiprolina (Hyd) e alanina (Al) (na posição Y) (GELSE; PO; AIGNER, 2003).

O colágeno tipo I (ColTipoI) (Figura 7) é a proteína fibrilar estrutural mais utilizada como biomaterial devido à alta similaridade da sequência de aminoácidos entre as diversas espécies, sua estabilidade conformacional, abundância na matriz extracelular e capacidade de suportar a adesão e proliferação celular. O ColTipoI

e III formam uma rede de apoio para as células favorecendo o alinhamento, resistência a tração e deformação, mantêm a forma e espessura, evita a ruptura, além de contribuir para a rigidez e formação tecidual (HARDING et al., 2008; PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).

.

Figura 7 - Representação esquemática da estrutura química do Colágeno tipo I, sendo gly (glicina), pro (prolina) e hyp (hidroxiprolina)



Fonte: https://www.proto-col.com/2014/07/collagen/

A densidade dos grupamentos terminais e laterais ácido como a carboxila (COOH) e básico como a amina (NH_2) conferem ao colágeno a característica anfotérica. Desta forma, fatores como pH do meio reacional, temperatura e força iônica irão influenciar se esta biomolécula ficará carregada negativamente (-COO) ou positivamente (NH_3^+). A alteração da densidade de carga influencia diretamente as propriedades funcionais e fibrilogênese devido às variações das interações eletrostáticas e hidrofóbicas do colágeno. As alterações nas interações eletrostáticas podem aumentar ou diminuir o diâmetro da fibrila de colágeno, e consequentemente a estrutura da proteína. Tais alterações afetam as propriedades emulsificantes, gelificantes e de retenção de água de produtos obtidos do colágeno (ACHILLI; MANTOVANI, 2010).

O processo de geleificação do colágeno ocorre em decorrência da formação de estruturas ordenadas e estabilizadas por ligações de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Durante a geleificação as proteinas livres e desordenadas são alteradas para um conformação heicoidal formando uma rede estruturada (NEKLYUDOV, 2003).

Do ponto de vista da biomecânica, os colágenos fibrilares (tipo I, II, III e V) são mais interessantes, pois ao se agregarem paralelamente forma fibrilas que conferem resistência e flexibilidade. Essas características fazem do colágeno um

biomaterial de interesse na área biomédica. O colágeno possui ainda, a capacidade de promover crescimento celular, motivo que favorece sua utilização em matrizes tridimensionais para regeneração tecidual (LEE; SINGLA; LEE, 2001).

A grande biocompatibilidade do colágeno, está associada à formação de uma rede polimérica que contém 99% de água. Essa característica confere a esses materiais a capacidade de mimetizar um ambiente semelhante aos tecidos naturais. No entanto, os polímeros naturais precisam ser associados a outros biomateriais para melhorar as propriedades biomecânicas. Em contrapartida, os polímeros naturais apresentam características fisiológicas mais favoráveis, tais como bioadesão seletiva, propriedades semelhantes à MEC, bem como atividade biológicas específicas (RATNER; BRYANT, 2004; TABATA, 2009; ZHANG; HU; ATHANASIOU, 2011).

Scf de colágeno podem ser fabricados pela técnica de liofilização, onde a solubilização em meio ácido contribui para a formação de ácido orgânico e é frequentemente adicionado para incentivar a formação de dendríticos na rede de cristais de gelo sem formação de ramificação lateral (ACHILLI; MANTOVANI, 2010).

Scf de colágeno serviu de suporte para crescimento de miócito ventriculares em ratos neonatos e as células desenvolvidas na estrutura contraíram ao estímulo mioelétrico de 2 ms,5 V/cm,1Hz (RADISIC et al., 2004).

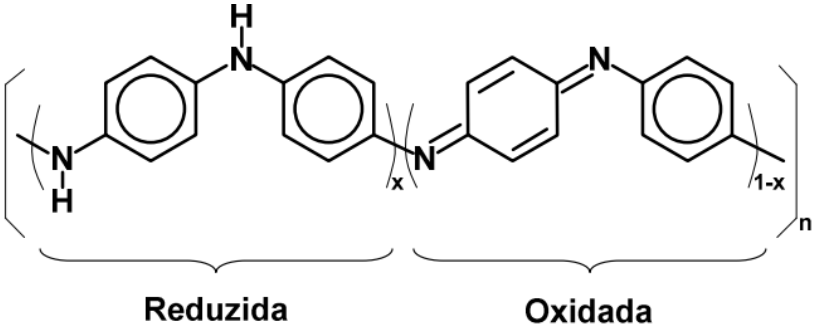
Zimmerman e colaboradores (2006) demonstraram que um Scf de colágeno pode deter a formação de fibrose no tecido cardíaco de ratos neonatos após a ocorrência do infarto do miocárdio. Scf de colágeno apresentaram capacidade de retenção celular, e desta forma pode ser considerado um regulador da adesão celular. Além disso, implantes acelulares de colágeno provocaram menor processo inflamatório no tecido adjacente saudável (HAO et al., 2007).

2.4.4 Polianilina

Polianilina (PANI) é um polímero linear obtido da oxidação química ou eletroquímica da anilina. A composição química na forma de base (não dopada) pode ser representada por sua estrutura química na forma reduzida e oxidada (Figura 8) e seus anéis podem existir nas formas benzenóides ou quinóides. A PANI é diferenciada dos demais polímeros por apresentar uma espécie de

dopagem (protonação reversível), que poder ser desprotonado na presença de uma base e novamente dopado, ocasionado pouca ou nenhuma degradação do polímero (SIRIVISOOT, 2014).

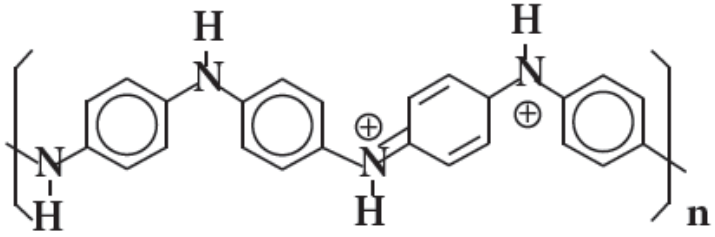
Figura 8 - Representação esquemática da estrutura molecular da polianilina na forma reduzida (ganho sw elétrons) e oxidada (perda de elétrons)



Fonte: https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/18472/18472_4.PDF

A forma totalmente reduzida e oxidada da PANI são chamadas, respectivamente, de forma leucoesmeraldina (apresenta cor azul) e forma pernigranilina (apresenta cor violeta), na forma meio oxidada (50%) é chamada de sal de esmeraldina (apresenta cor verde) (Figura 9). Todas as formas são isolantes, no entanto, quando a forma esmeraldina é dopada em meio ácido ocorre o aparecimento dos policátions e aumento na condutividade na ordem de dez vezes de magnitude (BOEVA; SERGEYEV, 2014).

Figura 9 - Representação esquemática da polianilina na forma de sal de esmeraldina (protonado - cor verde)



Fonte: (VARGAS et al., 2017)

Polímeros condutores (PC) como a PANI, apresentam diversas aplicações biomédicas tais como desenvolvimento de músculos artificiais, fabricação de biosensores, liberação controlada de fármacos e estimulação nervosa (RAVICHANDRAN et al., 2010 ; CUI; YANG; LI, 2016). PCs, como PANI, mostraram capacidade para modulação das atividades celulares, incluindo

adesão, fixação, migração, proliferação e diferenciação celular. Células cultivadas em substratos contendo PC influenciaram a modulação de alguns tipos de regeneração tecidual como tendões, pele, tecido cardíaco, tecido músculo esquelético e tecido ósseo (AZHARA; OLADA; SALEHIBC, 2014).

Scf formado por fibras poliméricas e PANI permitiu a condução de estímulo elétrico pela extensão do dispositivo. O estímulo elétrico gerado favoreceu a diferenciação das células mesenquimais e cardiomiócitos (BORRIELLO et al., 2011).

Sirivisoot e colaboradores (2014) obtiveram crescimento celular e condutividade do impulso elétrico em nanofibras de PEDOT poli (3,4-etilenodioxitiofeno) contendo 0,5% de PANI. As nanofibras apresentaram ainda, um aumento na condutividade do impulso elétrico em 400% quando comparada ao hidrogel de colágeno contendo células (SIRIVISOOT et al., 2014).

Construções eletricamente ativas podem ter um efeito benéfico em tecidos eletrorresistentes, como o cérebro, coração e sistema nervoso. PCs estão sendo considerados como componentes desses construtos devido à sua natureza eletroativa. Experimentos *ex vivo* revelaram que a natureza condutiva de biomateriais tem um efeito imediato sobre a eletrofisiologia do coração (MAWAD et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

- ✓ Projetar, desenvolver e avaliar *in vitro*, *scaffold* microparticulado e *scaffold* laminar, acelulares, para regeneração e recuperação funcional do músculo cardíaco afetado por isquemia do miocárdio.

3.2 Específicos:

3.1.1 *Scaffold* microparticulado

- ✓ Avaliar a técnica de obtenção de microesferas usando princípios de geleificação ionotrópica.
- ✓ Avaliar a condutividade do impulso elétrico.
- ✓ Caracterizar e avaliar características morfológicas.
- ✓ Caracterizar e avaliar as propriedades físico-química.

3.1.2 *Scaffold* laminar

- ✓ Avaliar a técnica de extensão de hidrogel para preparação de *scaffolds* laminares.
- ✓ Avaliar o efeito de diferentes temperaturas de congelamento.
- ✓ Caracterizar e avaliar as características morfológicas.
- ✓ Caracterizar as propriedades fisiomecânicas e físico-químicas.
- ✓ Avaliar a hidrofilicidade, desintegração e mucoadesão.

4 MATERIAL E MÉTODO

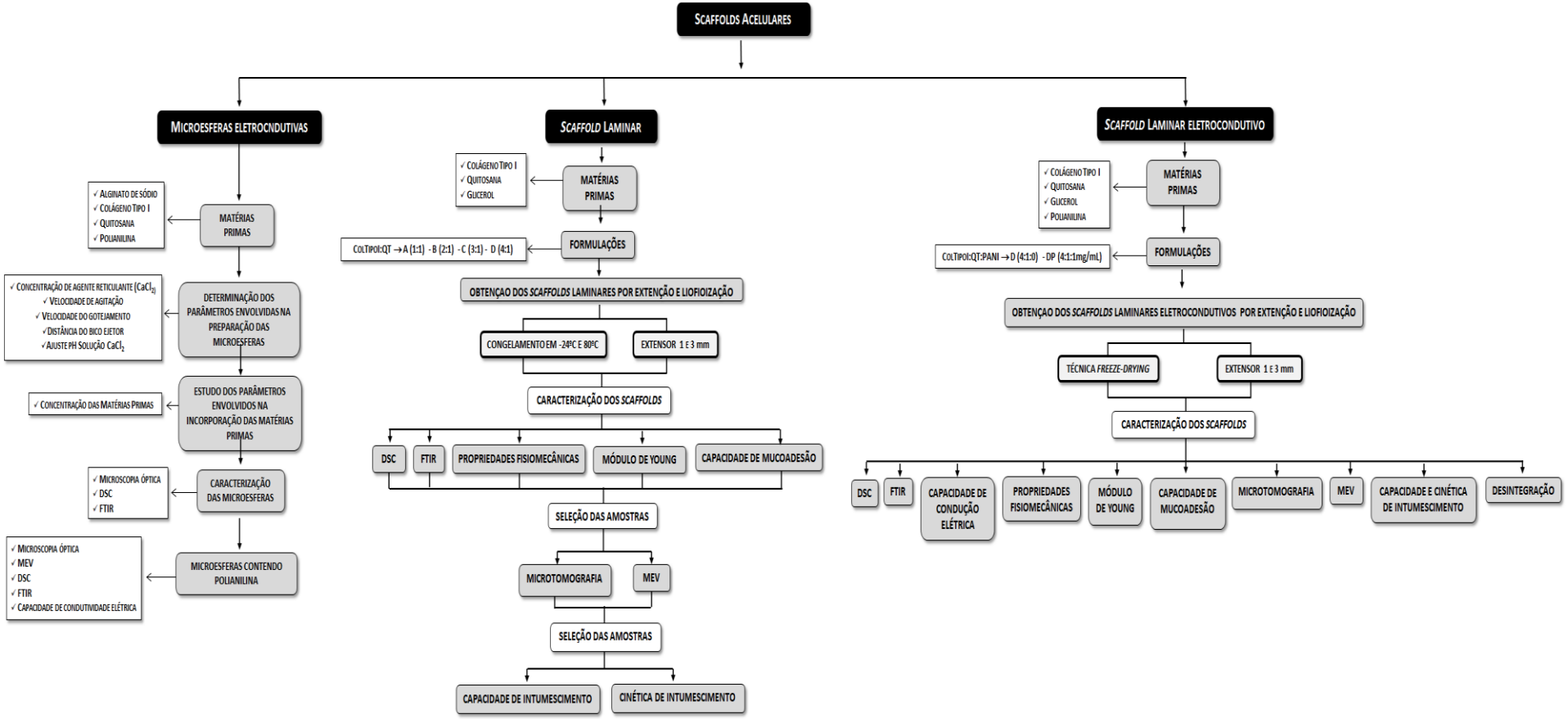
4.1 Material

Quitosana de baixa massa molar (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA), alginato de sódio de média viscosidade (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA), colágenos em pó do Tipo I (entre 0,45 a 0,57 mm) gentilmente doado por Novaprom Food Ingredients (Lins, SP), anilina e persulfato de amônio (Labsynth, Diadema, Brasil). As demais matérias primas utilizadas eram de grau de pureza para uso farmacêutico.

4.2 Método

A Figura 10 mostra o delineamento experimental referente as etapas envolvidas no desenvolvimento dos Scf acelulares.

Figura 10 – Delineamento experimentalo das etapas envolvidas no desenvolvimento dos *scaffolds* acelulares



Fonte: Elaboração própria

Legenda: Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC – Differential Scanning Calorimetry), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR - Fourier transform infrared spectroscopy), MEV – microscopia eletrônica de varredura

4.3 Determinação do ponto isoelétrico do colágeno tipo I

A determinação do ponto isoelétrico do Colágeno Tipo I (ColTipoI) foi realizada por meio de titulação potenciométrica. O colágeno (0,2 g) foi dissolvido em 20 mL de solução padronizada de ácido acético 0,1 N (pH 2,5), seguido de diluição em 10 mL de água deionizada. A titulação potenciométrica foi realizada com solução padronizada de NaOH 25mN (pH 8,0). Os pH e volume de NaOH adicionado foram registrados. Uma segunda titulação foi realizada dissolvendo 0,2 g de colágeno em solução padronizada de NaOH 0,1 N (pH 11,0), seguido de diluição em 10 mL de água deionizada. A titulação potenciométrica foi realizada com solução padronizada de HCl 25mN v Com base nos resultados foi construído um diagrama binário para traçar a curva pH x volume na solução padronizada.

4.4 Preparação da polianilina

Para a preparação da polianilina (PANI), 7,5% de persulfato de amônio ($(NH_4)_2S_2O_8$) foi dissolvido em solução de HCl 1M. Resumidamente, a formação da PANI na forma de sal de esmeraldina oxidada foi obtida pela mistura de 20mL de HCl 1M com 80 mL da solução a 7,5% de $(NH_4)_2S_2O_8$). A mistura das soluções foi realizada com agitação constante durante 2 h. A temperatura do sistema foi mantida constante (-10ºC). A PANI foi separada do meio reacional por filtração e armazenada ao abrigo da luz em dessecador até peso constante.

4.5 Preparação do *Scaffolds* acelulares

4.5.1 Preparação do *Scaffold* microparticulado

A. Preparação da dispersão de alginato de sódio

A dispersão aquosa de alginato de sódio (AS) a 1,5% (m/v) foi preparada sob agitação mecânica a 7000 rpm (Ultra Turrax – T-25D – IKA, Staufen, Germany), até completa homogeneização e mantida em repouso para eliminação das bolhas

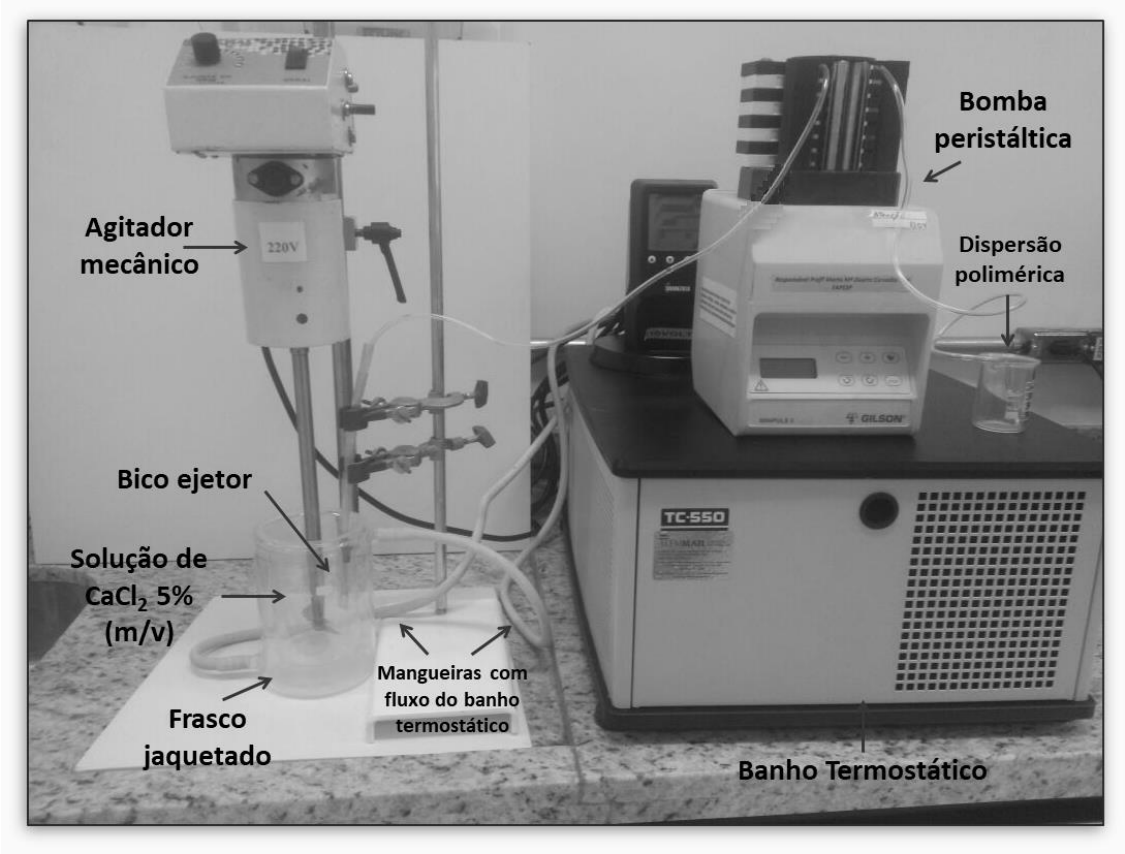
B.Técnica de preparação das microesferas poliméricas

Experimentos preliminares foram realizados para determinar a melhor concentração da dispersão de alginato de sódio, do agente reticulante ($CaCl_2$), pH

do meio, tempo de reação e velocidade de agitação, bem como a altura do bico ejetor em relação à superfície da solução aquosa de $CaCl_2$

As microesferas foram obtidas por geleificação ionotrópica de alginato de sódio (1,5%) com $CaCl_2$ 5% (m/v) conforme descrito por Wang et al. com pequenas modificações (WANG et al., 2007). O sistema de gotejamento (Figura 11) foi montado com uma bomba peristáltica (MINIPULS 3 – GILSON, Villiers le Bel, França), agitador mecânico (TE-039 – TECNAL, Piracicaba, Brasil) e frasco de reação de bancada cilíndrico e jaquetado acoplado a um banho termostático (TC-550 – Brookfield, Toronto, Canadá).

Figura 11 - Sistema de preparação para obtenção de microesferas pelo método de geleificação ionotrópica da dispersão polimérica de alginato de sódio.



Fonte: Elaboração própria

As dispersões poliméricas (Tabela 1), livres de bolha de ar, foram transferidas para a solução concentração de $CaCl_2$ (pH 5,0) com taxa de fluxo de 0,5 mL/min. O volume de cada gota foi controlado por um bico ejetor com diâmetro de 0,3 mm e mantido a 2 cm de altura da solução de $CaCl_2$. Durante a etapa de transferência de

massa, a agitação (300 rpm) e a temperatura (25ºC) do meio reacional foram mantidas constantes. As microesferas obtidas foram retiradas da solução de $CaCl_2$, lavadas com água purificada e mantidas sob agitação em solução de $CaCl_2$ 5% (m/v) dentro de incubadora orbital (TE-399 – TECNAL, Piracicaba Brasil) ajustada para 100 rpm, na temperatura de 25ºC durante 72 h. Após esse processo as microesferas foram novamente lavadas com água purificada e mantidas em solução etanólica a 70% (v/v) durante 5 min. Água superficial foi removida em estufa com circulação forçada de ar (TE-394/2 –TECNAL, Piracicaba, Brasil) e temperatura ajustada para 30ºC. A remoção de água aderida na superfície das microesferas foi determinada por gravimetria.

B. Otimização das microesferas poliméricas de alginato de cálcio pela incorporação de Quitosana – Colágeno e Polianilina

As microesferas de alginato de cálcio (AC) (Tabela 1 - F2) foram otimizadas com dispersões aquosas QT, ColTipoI e PANI, em diferentes concentrações, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Microesferas obtidas com alginato de sódio, quitosana, colágeno tipo I e polianilina

MICROESFERAS	CONCENTRAÇÃO (%) DAS MATÉRIAS PRIMAS					pH $CaCl_2$
	AS (%)	ColTipoI (%)	QT (%)	PANI (mg/mL)	$CaCl_2$ (%)	
F1	1,5	-	-	-	5	7,25
F2	1,5	-	-	-	5	5,0
F3	1,5	-	1,5	-	5	5,0
F4	1,5	1,5	-	-	5	5,0
F5	1,5	1,5	1,5	-	5	5,0
F6	1,5	-	-	5	5	5,0
F7	1,5	1,5	1,5	5	5	5,0

Fonte: Elaboração própria

Legenda: **F** – Formulações, **AS** – Alginato de sódio, **QT** – Quitosana, **ColTipoI** – Colágeno tipo I, **PANI** – Polianilina, **$CaCl_2$** – Cloreto de Cálcio, **pH** – Potencial hidrogeniônico**.**

As microesferas F1 e F2 foram obtidas pela reticulação da dispersão de AS 1,5% (m/v) com Ca^{2+} presente na solução $CaCl_2$ com pH ajustado para 7,25 e 5,0, respectivamente. A dispersão de QT foi homogeneizada na solução de $CaCl_2$ 5% (m/v) pH 5,0. Para a obtenção da formulação F3 (Tabela 1), a dispersão de AS foi gotejada com taxa de fluxo de 0,5 mL/min (Bomba peristáltica – MINIPULS 3 – GILSON, Villiers le Bel, França) no $CaCl_2$ 5% (m/v) contendo QT (pH 5,0).

A dispersão de ColTipoI foi homogeneizada na solução de $CaCl_2$ 5% (m/v) pH 5,0. Para a obtenção da formulação F4, a dispersão de AS foi gotejada com taxa de fluxo de 0,5 mL/min na solução de $CaCl_2$ 5% (m/v) contendo ColTipoI (pH 5,0).

As dispersões de ColTipoI e QT foram dispersas na solução $CaCl_2$ 5% (m/v) pH 5,0. Para a obtenção da formulação F5, a dispersão de AS foi gotejada com taxa de fluxo de 0,5 mL/min na solução de $CaCl_2$ 5% (m/v) contendo ColTipoI e QT (pH 5,0).

Para a obtenção da formulação F6, a PANI (5mg/mL) foi incorporada na dispersão de AS 1,5% (m/v) sob agitação mecânica (7000 rpm), até completa homogeneização. Para a eliminação de bolhas de ar a dispersão de AS-PANI foi armazenada sob refrigeração (10ºC) durante 24 h. A dispersão de AS-PANI foi gotejada com taxa de fluxo de 0,5 mL/min na solução de $CaCl_2$ 5% (m/v) pH 5,0.

Para a obtenção da formulação F7 a PANI (5 mg/mL) seguiu os mesmos procedimentos realizados para a formulação F6. A dispersão de ColTipoI e QT (Tabela 1) foram homogeneizadas na solução de $CaCl_2$ 5% (m/v) pH 5,0. A dispersão de AS-PANI foi gotejada na solução de $CaCl_2$ 5% (m/v) pH 5,0 contendo ColTipoI e QT.

4.5.2 Preparação dos *Scaffold* laminares

A. Preparação das dispersões poliméricas

A dispersão de ColTipoI 10% (m/v) e QT 2,0% (m/v) foram preparadas com ácido acético 0,5% (v/v). A dispersão de ColTipoI-QT foi ajustada para pH 5,0. As formulações foram obtidas pela homogeneização das dispersões de ColTipoI 10% (m/v), QT 2,0% (m/v) e glicerol em diferentes razões mássicas (Tabela 2). As dispersões foram mantidas sob refrigeração (10ºC), durante 24 h. As dispersões poliméricas foram previamente aquecidas a 35ºC (banho termostático Brookfield – TC 550, Massachusetts, USA) antes de serem transferidas para o extensor.

Tabela 2 - Formulações das dispersões poliméricas A, B, C e D para preparação de *scaffols* laminares

AMOSTRA	RAZÕES MÁSSICAS DAS DISPERSÕES POLIMÉRICAS EM g		
	ColTipoI	QT	Gli (%)
A	1	1	5
B	2	1	5
C	3	1	5
D	4	1	5

Fonte: Elaboração Própria

Legenda: **QT** – Quitosana, **ColTipoI** – Colágeno tipo I, **Gli** – Glicerol

B. Preparação das dispersões poliméricas com capacidade eletrocondutiva

A dispersão de ColTipoI 10% (m/v) foi preparada em ácido acético 0,5% (v/v). A dispersão de QT 2,0 % (m/v) foi preparada em ácido acético 1,5% (v/v). Para a obtenção da dispersão QTP 2% (m/v) a massa de 5 mg/mL da PANI foi adicionada ao ácido acético 1,5 (v/v), agitado a 7000 rpm até total homogeneização e adicionado QT. A formulação D (Tabela 2) foi obtida pela mistura da razão mássica de 4:1 (ColtipoI:QT) adicionada de 5% de glicerol. A formulação DP foi obtida pela mistura da razão mássica de 4:1 (ColTipoI:QTP) adicionada de 5% de glicerol. As dispersões foram refrigeradas (-10ºC), durante 24 h. Para se obter uma viscosidade adequada para o processo de extensão, as dispersões poliméricas foram aquecidas em banho termostático (Brookfield – TC 550, Massachusetts, USA) mantido a uma temperatura de 35ºC.

C. Preparação dos *scaffolds* laminares

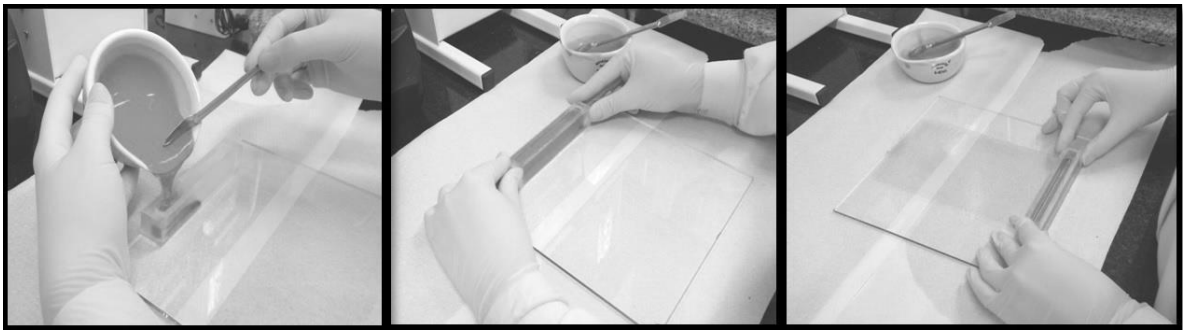
Para a obtenção dos Scf laminares as dispersões poliméricas (A-D) foram estendidas, separadamente, utilizando extensores de acrílico com aberturas de1 mm ou 3 mm para vazão (Figura 12). O extensor contendo a dispersão polimérica foi deslocado com velocidade constante sobre uma placa de vidro previamente desengordurada (Figura 13). Para avaliar a influência da temperatura no processo de formação dos poros dos Scf, as dispersões poliméricas estendidas sobre placas

de vidro e congeladas em refrigerador (-8ºC) ou ultrafreezer (-80ºC). As amostras foram mantidas sob congelamento durante 6 horas e liofilizadas durante 24 h. As amostras obtidas com extensor de 1 mm e congeladas a -8ºC (C) e -80ºC (UT) foram nominadas, respectivamente, por A1C, B1C. C1C, D1C, e A1UT, B1UT. C1UT, D1UT. As amostras obtidas com extensor de 3 mm foram nominadas, respectivamente, por A3C, B3C. C3C, D3C, e A3UT, B3UT. C3UT. D3UT. As dispersões poliméricas (D) contendo PANI foram obtidas com extensor de 1 mm e 3 mm, congeladas a -8ºC (C) e -80ºC (UT) e nominadas respectivamente, de DP1UT e DP3UT.

Figura 12 - Extensor de acrílico com abertura para vazão de 3 mm, 1 cm de largura e 18 cm de comprimento

Fonte: Elaboração própria

Figura 13 - Extensão da dispersão polimérica sobre placa de vidro com auxílio do extensor de acrílico.



Fonte: Elaboração própria

4.6 Métodos de caracterização

4.6.1 Avaliação das características morfológicas das microesferas

As dimensões e característica de superfície das microesferas foram avaliadas em microscópio óptico (Zeiss – Axio Vert A1, Jena, Germany) com magnitude de 10x. As imagens foram capturadas em câmera fotográfica acoplada ao microscópio e digitalizadas.

4.6.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para a caracterização termoanalítica das amostras foi utilizado DSC (Thermal Analyzer TA 60W - Shimadzu DSC-60, Kyoto, Japan) em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 $mLmin^{-1}$, sob uma razão de aquecimento de 10°C min^{-1}. Para a avaliação das matérias primas, microesferas secas (F2 - F7) e Scf laminares foram alocados em cadinho de alumínio hermeticamente fechado com aproximadamente 2 mg de amostra, como referência foi utilizado cápsula vazia. O teor de água presente nas matérias primas e nos Scf foi avaliado em balança analítica acoplada a sistema de secagem por radiação infravermelha (Shimadzu - MOC-63U, Kyoto, Japan). As condições de secagem foram mantidas em modo “slow”, 60ºC, variação de peso de 5%, e precisão de 0,001 g.

4.6.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização dos grupamentos químicos específicos das matérias primas foi realizada em FTIR (Shimadzu, FTIR IRAffinity-1S. Kyoto, Japão) com resolução de 4 cm^{-1} e 128 scans. Para a avaliação dos espectros das matérias primas e microesferas (F2 – F7) as pastilhas foram preparadas misturando 300 mg de KBr e aproximadamente 2 mg de matérias primas e de microesferas previamente trituradas. Os espectros foram obtidos pela varredura na faixa de 4000 a 400 cm^{-1}. Os espectros dos Scf laminares foram obtidos no modo de reflectância total atenuada (ATR) e varredura na faixa de 4000 a 600 cm^{-1}. Os espectros foram normalizados e as bandas de vibração foram associadas às ligações químicas covalente para cada material avaliado.

4.6.4 Avaliação da capacidade de condutividade do impulso elétrico

As medidas de condutividade do impulso elétrico foram realizadas por método adaptado de Tang; Wu e LIN (2008) utilizando condutivímetro (MCA 150P, MS Tecnopon Instrumentação, Piracicaba, Brasil). As alíquotas de 10 e 20 mg de microesferas F2, F6 e F7, e amostras de 1cm^2 e 2 cm^2 dos Scf laminares D1UT, DP1UT, D3UT DP3UT foram imersos, separadamente, em 10 mL de água ultrapurificada. Após 30 min o eletrodo juntamente com probe de controle de temperatura foram introduzidos no meio e a condutividade foi registrada. A condutividade do impulso elétrico da água ultrapura foi previamente avaliada.

4.6.5 Propriedades fisiomecânicas e de mucoadesão dos Scf laminares

As propriedades fisiomecânicas e de mucoadesão dos Scf laminares foram avaliadas utilizando texturômetro (Stable Micro Systems - TA-XT Plus, Surrey, Reino Unido) no modo de compressão para avaliação da mucoadesão, resistência mecânica à perfuração, flexibilidade e módulo de elasticidade e no modo de tensão para o ensaio resistência ao alongamento. Os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 3. As medidas foram registradas pelo software Exponente Texture Analysys.

Tabela 3 - Parâmetros utilizados na avaliação das propriedades fisiomecânicas dos Scf laminares

Parâmetros	Elongação	Perfuração	Relaxação
Aparato	Presilhas Código A/MTG	Suporte para filme Código HDP/FSR	Suporte pra filme Código HDP/FSR
Modo Teste	Tensão	Compressão	Compressão
Velocidade pré teste	1 mm/s	2 mm/s	1 mm/s
Velocidade teste	0,5 mm/s	0,5 mm/s	0,5 mm/s
Velocidade pós teste	10 mm/s	10 mm/s	10 mm/s
Modo	Distância	Distância	Distância
Distância	25 mm	12 mm	3 mm
Tipo de movimentação	Auto	Auto	Auto
Força	0,049 N	049 N	0,049 N

Fonte: Elaboração própria

A. Resistência a perfuração, flexibilidade e módulo elasticidade

Para avaliar a resistência fisiomecânica dos Scf laminares amostras de 2 cm^2 foram fixadas entre duas placas perfuradas (HDP/90) previamente fixadas à plataforma do equipamento. O probe (P/5S) foi comprimido no sentido apical → basal sobre a superfície das amostras, com força de compressão de 0,049 N. O ensaio de perfuração, flexibilidade e elasticidade foram realizados a uma velocidade de 0,5 $mm.s^{-1}$. Para o ensaio de módulo de elasticidade (ou módulo de Young) a tensão variou entre 0 e 5%.

B. Resistência ao alongamento

Para avaliar a resistência ao alongamento (ruptura), as extremidades dos Scfs laminares (2 cm altura x 3 cm de comprimento) foram fixadas por presilhas (*Mini Tensile Grips)*, cujas braçadeiras foram posicionadas a uma distância de 2 cm uma da outra. As faces internas das presilhas foram recobertas com fita de papel plastificado para minimizar o efeito dos sulcos das presilhas sobre a resistência dos Scfs.

C. Capacidade de Mucoadesão

A capacidade de mucoadesão foi avaliada pela força máxima ($F_{máx}$) necessária para destacar o disco de mucina do Scf laminar após um tempo de contato previamente determinado. Os discos de mucina com 8 mm de diâmetro e 0,2 mm de espessura foram preparados por compressão mecânica (Lemaq, Máquina compressora rotativa, Mini Express LM-D8, Diadema, BR), utilizando punções planas, matriz cilíndrica de 8 mm e carga de compressão de 8 toneladas. Os Scfs laminares com dimensão de 3 cm^2 foram fixadas em plataforma apropriadas (A/MUC) e mantidas aquecidas (37ºC). Os discos de mucina foram previamente umidecidos e fixados na sonda analítica (P/10). O disco de mucina foi comprimido no sentido apical → basal sobre a superfície das amostras, com força de compressão de 5,0 N. Os tempos de contato do disco com a superfície das amostras foram de 60s, 120s e 180s. O deslocamento da sonda analítica no sentido basal – apical foi programada para 0,5 $mm.s^{-1}$. A força necessária para separar o disco de mucina da superfície do Scf foi determinada pela relação tempo (s) x força (N).

4.6.6 Microtomografia computadorizada (µCt) dos Scf laminares

As características estruturais de porosidade, interconectividade dos poros e grau de anisotropia dos Scfs laminares B1C, B1UT, B3C, B3UT, D1C, D1UT, D3C, D3UT, DP1UT e DP3UT foram determinadas por µCT. A imagem dos Scfs foi capturada por microtomógrafo X-Ray (Brucker-micro CT - SkyScan 1174, Kontich, Bégica). Modelos virtuais em 3D representativos de várias regiões dos Scfs foram criados, visualizados e registrados. Os dados foram tratados matematicamente pelo software CT Analyser v. 1.13.5.

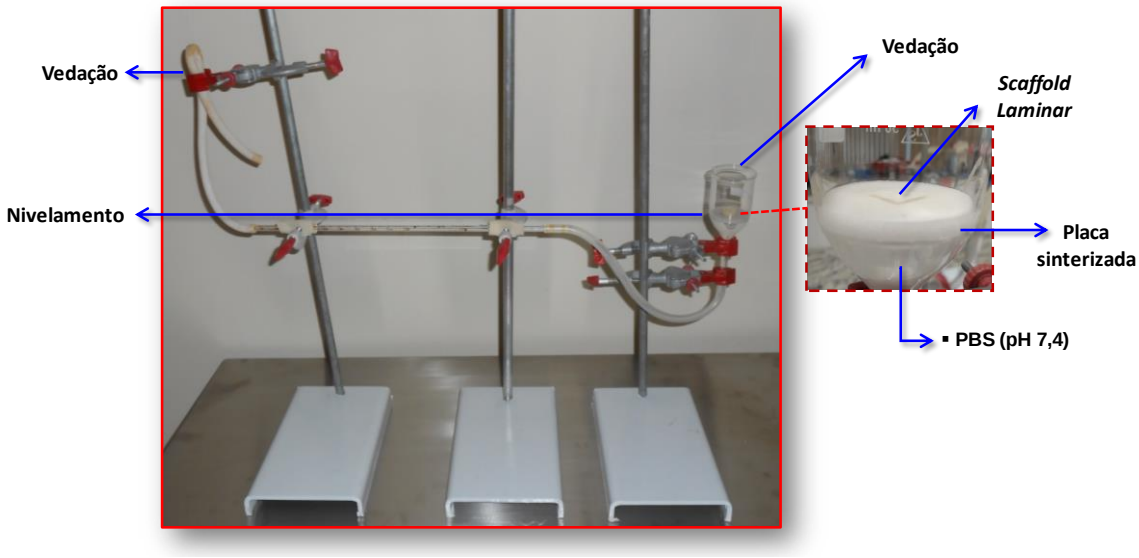
4.6.7 Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV)

As características morfológicas das microesferas F6 e F7 e dos Scf laminares B1C, B1UT, B3C, B3UT, D1C, D1UT, D3C, D3UT, DP1UT e DP3UT foram avaliadas por MEV (Sputter Coater EMITECH, Modelo: K450, Kent, Reino Unido). Uma pequena porção das amostras foi colocada em uma fita adesiva de carbono dupla face presa a um stub de alumínio. Os suportes foram recobertos com uma fina camada de ouro no metalizador (SC7620 Spatter Coater). As amostras foram submetidas à condição de vácuo, o gás argônio foi liberado como meio que forma o plasma para ionizar a placa metálica de ouro e a corrente foi ajustada para 3 mA, durante 40 min para obter um filme de recobrimento com espessura ~92 Å. Em seguida, as amostras foram aleatoriamente microfotografadas e digitalizadas. Para a análise das amostras foi utilizado tensão de aceleração igual 15 kV e corrente do feixe igual a 100 pA.

4.6.8 Capacidade de intumescimento dos *scaffolds* laminares

A capacidade de intumescimento foi avaliada pela hidrofilicidade dos Scf laminares B1UT, D1UT, DP1UT, B3UT, D3UT e DP3UT em PBS (pH 7,4), até atingir ponto de equilíbrio de saturação. Neste estudo foi utilizado dispositivo Enslin-Neff (Figura 14). A capacidade de intumescimento foi determinada pelo volume de deslocamento do nível de água na pipeta micrométrica (µL) por massa (mg) da amostra em função do tempo, até que o volume absorvido se mantivesse constante após 3 medidas consecutivas com 3 intervalos de 1 hora (ponto de equilíbrio de saturação).

Figura 14 - Sistema de intumescimento baseado no Dispositivo de Enslin-Neff utilizado para avaliar a capacidade de intumescimento dos Scf laminares B1C, B1UT, D1C, D1UT, DP1UT e DP3UT.



Fonte: elaboração própria

Os parâmetros da cinética de intumescimento foram obtidos por meio de medidas de grau de intumescimento em função do tempo (ln Q *vs* ln t). O expoente difusional (n) e constante de difusão (k) foram calculados utilizando a Equação 1.

$$Q = \frac{Mt}{Meq} = kt^n \quad (Equaçao\ 1)$$

Onde *Q* = grau de intumescimento, *Mt* é a massa do Scf intumescido em um tempo, Meq é a massa do Scf no ponto de equilíbrio de saturação, t é o tempo, *k* é conhecida como constante de difusão e depende do tipo do polímero e do meio de intumescimento. A Equação 1 pode ser aplicada desde os estágios iniciais até 60 % da curva de ln Q *vs* ln t.

4.6.9 Avaliação da desintegração *in vitro* pelo método de imersão

A desintegração dos Scf laminares D1UT, D3UT, DP1UT e DP3UT foi avaliada durante 60 dias (MEKALA et al., 2013). Os Scfs foram seccionados em tamanhos uniformes (1 cm^2), pesados e imersos, separadamente, em tubo Falcon contendo PBS pH 7,4, mantidos sob agitação de 120 rpm e temperatura de 37±1ºC. Em

intervalos de tempo correspondente a 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias os Scf foram retirados pesados, secos e novamente pesados. A perda de massa foi avaliada por gravimetria em balança analítica acoplada a sistema de secagem por radiação infravermelha (Shimadzu - MOC-63U, Kyoto, Japan). As condições de secagem foram mantidas em modo “slow”, 60ºC, variação de peso de 5%, e precisão de 0,001g.

4.7 Análise estatística

A determinação da significância expressos em média e desvio padrão para *n=3* foram realizadas pela análise de variância (ANOVA). Se detectada uma diferença significativa, num conjunto de dados, o teste Tukey foi utilizado para comparar as diferenças significativas entre os grupos. Todos os testes foram realizados com um intervalo de confiança de 95% ($p<0,05$).

4.8 Seleção das melhores amostras de microesferas e Scf laminar

As microesferas foram selecionadas a partir dos resultados obtidos nas análises morfológicas, FTIR, DSC e capacidade de condução elétrica. As microesferas selecionadas foram avaliadas por ensaios de MEV.

Os Scf laminares foram selecionados a partir dos resultados obtidos nas análises de FTIR, DSC, ensaio de propriedades fisiomecânicas e propriedade mucoadesiva. Os Scf selecionados foram avaliados por ensaios de µCt e MEV. Os Scf que apresentaram estrutura porosa mais homogênea, maior percentual de porosidade, interconectividade dos poros e maior grau de anisotropia, propriedades fisiomecânicas e mucoadesivas mais biomiméticas com o tecido cardíaco foram selecionados para a realização dos ensaios de capacidade de intumescimento. Para a preparação do Scf contendo PANI foi selecionado os Scfs laminares que apresentaram maior percentual de porosidade, maior grau de anisotropia e melhores propriedades fisiomecânicas e mucoadesivas. Os Scf selecionados foram submetidos a ensaio de desintegração durante 60 dias.

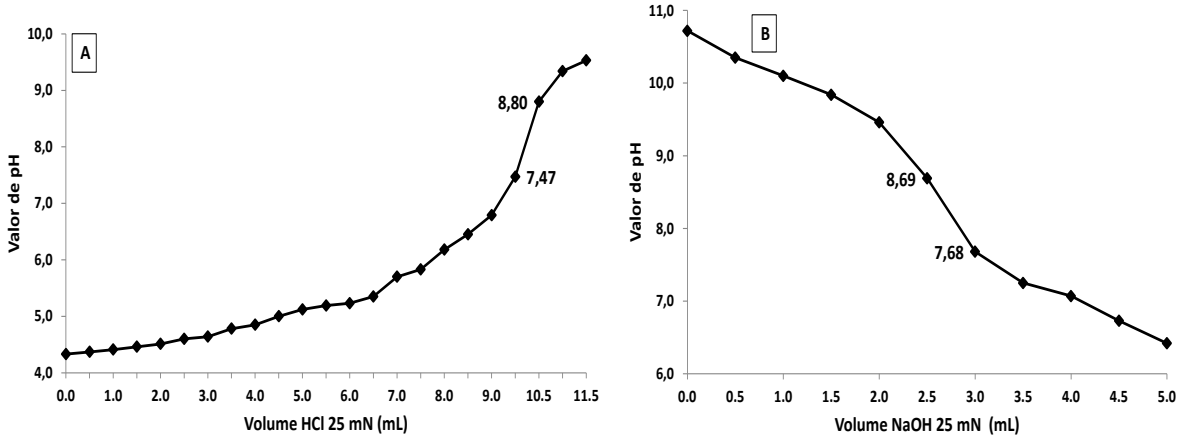
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização de matéria prima

5.1.1 Ponto isoelétrico do colágeno tipo I (ColTipoI)

A titulação potenciométrica do ColTipoI em meio alcalino (NaOH 25mM) (Figura 15-A) e em meio ácido (HCl 25mM) (Figura 15-B) apresentou, respectivamente, o ponto de inflexão entre os valores de pH 7,47- 8,8 e 7,68 - 8,69. Os resultados obtidos estão de acordo com Zhang, Li e Shi (2006) cujo ponto isoelétrico determinado para o ColTipoI foi 8,25.

Figura 15 - Curva potenciométrica do colágeno em HCl 25mM (pH 4,5) (A) e NaOH 25 mM (pH 8,0) (B)



Fonte: Elaboração própria

O ponto isoelétrico determina o valor de pH onde uma molécula apresenta carga elétrica líquida igual a zero. A carga líquida igual a zero é chamada de forma isoelétrica ou zwitteriônica. A determinação do ponto isoelétrico é um parâmetro importante e está relacionado com a solubilidade do ColTipoI. A existência de carga positiva ou negativa determina a interação com o meio aquoso, aumentando a interação com o solvente e favorecendo a solubilidade (ZHANG; LI; SHI, 2006; REIJENGA et al., 2013).

A determinação do ponto isoelétrico é um parâmetro importante para produção de géis de colágeno, pois as interações eletrostáticas são reguladas por fatores como pH e força iônica. Em pH alcalino, acima do ponto isoelétrico, há redução do diâmetro da fibrila, da capacidade de geleificação e alteração das

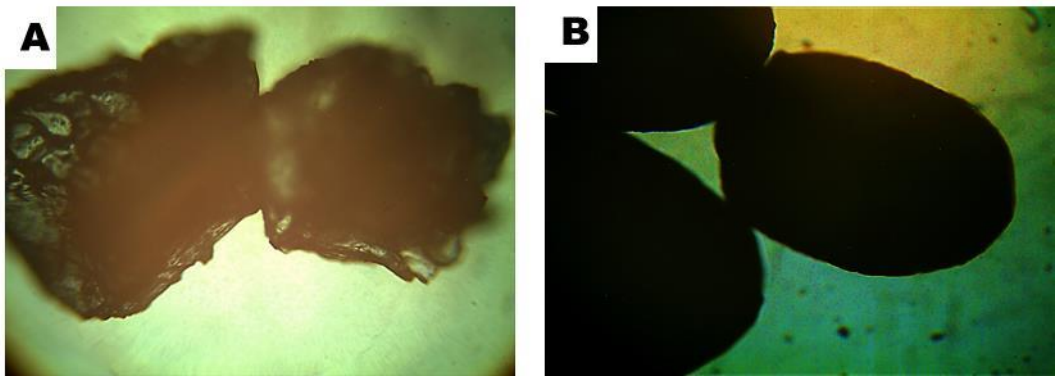
propriedades mecânicas. Em pH ácido, abaixo do ponto isoelétrico, ocorre a repulsão eletrostática ocorrendo a abertura da tripla hélice do colágeno, o que modifica a hidrofilicidade da superfície e melhora da capacidade emulsificante (WOODT; KEECHT, 1960; ACHILLI; MANTOVANI, 2010). Este comportamento físico-químico significa que a propriedade reativa do colágeno está relacionada ao ponto isoelétrico. Quando o colágeno está no ponto isoelétrico, ambos os grupos, carboxílico e amino, estão ionizados, com isso ocorrerá a atração entre as cargas opostas nas cadeias de proteína, diminuindo a distância entre as cadeias e a hidrofilicidade. O enovelamento das cadeias de proteína reduz os sítios para ligações de hidrogênio, com consequente diminuição da taxa de dissolução.

5.2 *Scaffold* Microparticulado

5.2.1 Avaliação dos parâmetros envolvidos na preparação das microesferas

Durante a preparação das microesferas poliméricas de AC (Figura 16 – Paineis A e B) foi observado que a concentração de $CaCl_2$ e o pH do meio geleificante influenciavam a morfologia das microesferas. Desta forma, foram testadas soluções contendo 1,5%, 3% e 5% de $CaCl_2$ e valores de pH 5,0 e 7,25. Após a avaliação por microscopia óptica foi selecionada a concentração de 5% (m/v) de $CaCl_2$ e pH 5,0 para a preparação das microesferas poliméricas.

Figura 16 - Imagem da microscopia óptica das microesferas de alginato de cálcio (F2) após secagem em estufa. Painel (A) solução de CaCl2 a 5% e pH 7,25 e painel (B) solução de CaCl2 a 5% e pH 5,0.



Fonte: Elaboração própria

Outro fator que influenciou a formação das microesferas foi à viscosidade do meio reacional. Devido à viscosidade resultante da mistura da dispersão de QT e

ColTipoI na dispersão AS foi utilizado como alternativa incorporar a dispersão de QT e ColTipoI na solução de $CaCl_2$ 5% (m/v) pH 5,0 em proporções mássicas de 1,5:1,5:5 (ColtipoI:QT:$CaCl_2$) para obtenção das microesferas F3, F4 e F7.

O Scf não deve ser apenas um molde arquitetônico com função de preenchimento, o mesmo deve ser capaz de mimetizar o tecido de interesse gerando sinais específicos como correntes elétricas, conformações moleculares e agregação celular responsável pela remodelação do tecido (LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008). Para tanto, os biomateriais (ColTipoI – QT – PANI) selecionados para a otimização das microesferas de AC foi baseado na composição da MEC do tecido cardíaca, necessidade de bioadesão do Scf no tecido lesionado e à propriedade de condutividade dos impulsos elétricos presente no músculo cardíaco.

Neste estudo as microesferas foram obtidas pelo método de geleificação ionotrópica, trata-se de um fenômeno químico que ocorre pelo uso de polissacarídeos aniônicos, como o alginato, goma carragena e pectina associado a íons catiônicos que reticulam o polímero (MAESTRELLI et al., 2008). Para que a geleificação ionotrópica ocorra, a dispersão do polímero com predominância de carga eletronegativa é gotejada sobre uma solução iônica contendo cátions polivalentes (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Al^{3+}). O Resultado da reticulação é a formação de uma estrutura tridimensional rígida do polímero. No caso do AS a geleificação ocorre pela formação de ligações entre os grupos carboxílicos aniônicos (COO-) do ácido α-L-gulurônico (bloco G) com os cátions bivalentes (WANG et al., 2007) representado na Figura 5b. A substituição dos íons de sódio (Na^{+}) pelo cálcio (Ca^{2+}) na cadeia polimérica resulta na formação do alginato de cálcio (AC). A mudança iônica é responsável pela formação estrutural responsável pela formação de estrutura esférica, devido a mudança de estrutura linear do alginato em estrutura tridimensional.

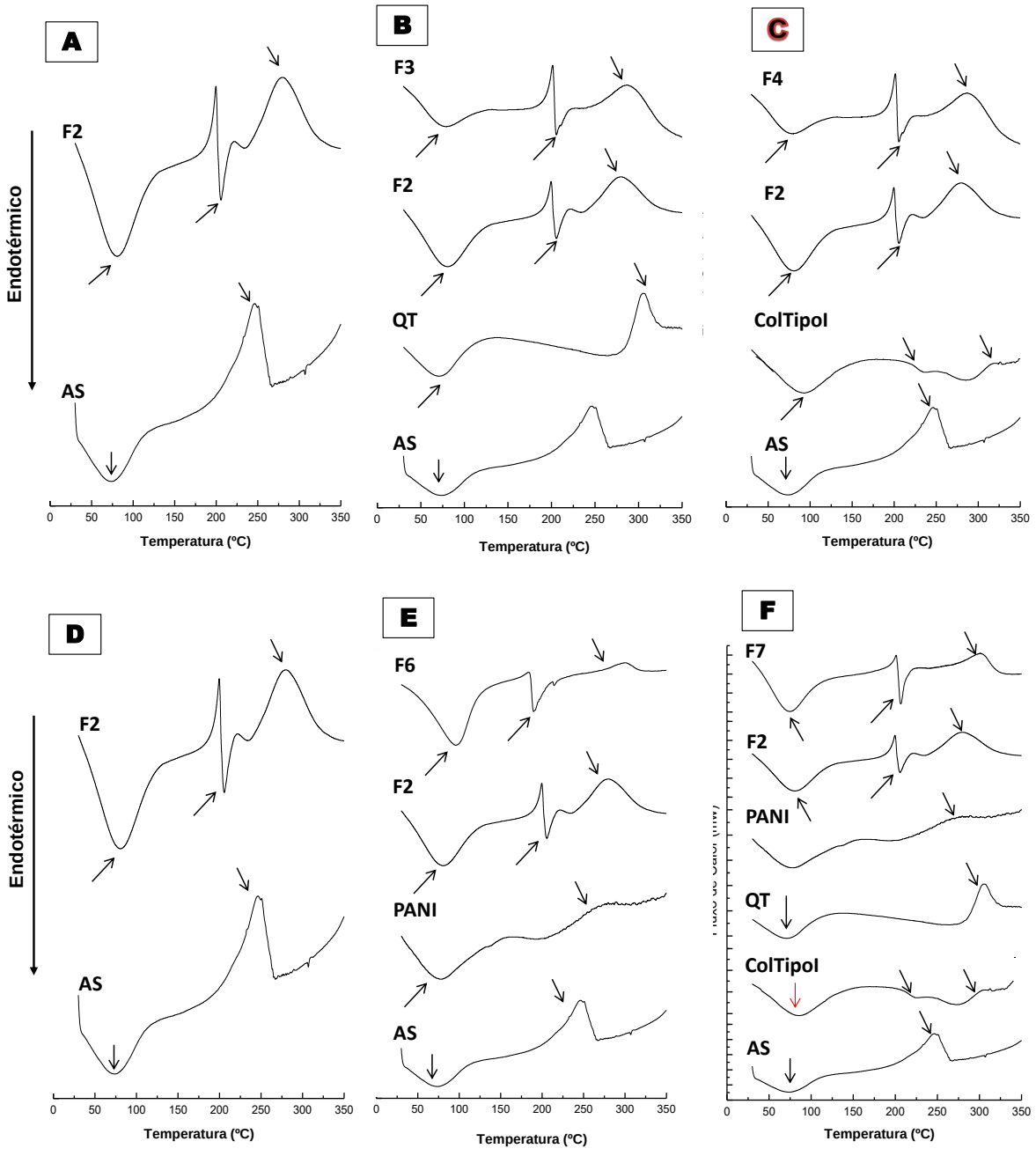
Para a formação dos *scaffolds* microparticulados é necessário que ocorra o agrupamento das microesferas anterior ao tecido lesionado. As microesferas quando agrupadas, irão formar estruturas 3D com excelentes propriedades fisiomecânicas, biocompatibilidade e biodesintegração, além de ser capaz de produzir poros com elevado grau de interconecção (GUPTA et al., 2017). O aumento da superfície de contato proporcionar um microambiente hidrodinâmico favorável à infiltração de células e vasos sanguíneos, bem como à difusão fisiológica de oxigênio e nutrientes para a proliferação celular e eliminação de metabólitos. Essas propriedades irão

contribuir na deposição da nova matriz extracelular (MEC) nos espaços de interconexão entre os poros, favorecendo a regeneração do tecido lesionado (SPAANS et al., 1998; TAKAHASHI; YAMAMOTO; TABATA, 2005).

5.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas termoanalíticas das matérias primas (AS, ColTipoI, QT e PANI) e das microesferas F2, F3, F4, F5, F6 e F7 são apresentadas na Figura 17 (painéis A-F) e Tabela 5.

Figura 17 - DSC das matérias primas AS (A-F), QT (B, D, F), ColTipoI (C, D, F) e PANI (E, F) e microesferas F2 (A-F), F3 (B) F4 (C), F5 (D), F6 (E), F7 (F)



Fonte: Elaboração própria

Tabela 4 - Temperatura referente à perda de água residual, variação de entalpia, cristalização e degradação matérias primas (AS, ColTipoI, QT e PANI) e microesferas F2 - F7

Materiais	Perda de água residual		Decomposição	Degradação
	Temp ºC	Entalpia J/g (∆H)	Temp ºC	Temp ºC
AS	76	-	-	245
ColTipoI	85	-	-	314
QT	71	-	-	305
PANI	77	-	-	245
F2 (AC)	80	161	191	244
F3	78	17	205	286
F4	70	60	215	321
F5	72	83	200	274
F6	96	147	183	300
F7	74	85	206	301

Fonte: Elaboração própria

Legenda: **AS** – Alginato de sódio puro, **QT** – Quitosana pura, **ColTipoI** – Colágeno tipo I puro, **F2** – Microesferas de alginato de cálcio ($CaCl_2$ pH 5,00), **F3** – Microesferas de alginato de cálcio + quitosana, **F4** – Microesferas de alginato de cálcio + colágeno tipo I.

Os resultados mostram que os primeiros eventos térmicos ocorreram nas temperaturas de 70ºC (F4) (painel C) a 96ºC (F6) (Figura 17 - painel E), correspondem à eliminação da água residual. A entalpia de mudança de estado líquido para vapor ocorre com o aumento da temperatura e pressão. O aumento da energia fornecida ao sistema resulta em um evento endotérmico. Os diferentes valores de entalpia das substâncias ocorrem devido em função da força de interações moleculares e das massas de seus componentes (GEROLA et al., 2010).

As microesferas F6 apresentaram maior temperatura (pico endotérmico) para desidratação da amostra. Esse resultado é devido à ligação iônica entre os grupos carboxílicos aniônicos (COO-) do ácido α-L-gulurônico (bloco G) (WANG et al., 2007) com os policátions (imina e amina) presentes no sal de esmeraldina (BOEVA; SERGEYEV, 2014).

Os segundos picos endotérmicos observados nas microesferas (Figura 17 - Paineis A – F) é referente à quebra das ligações cálcio-carboxilato no decorrer da

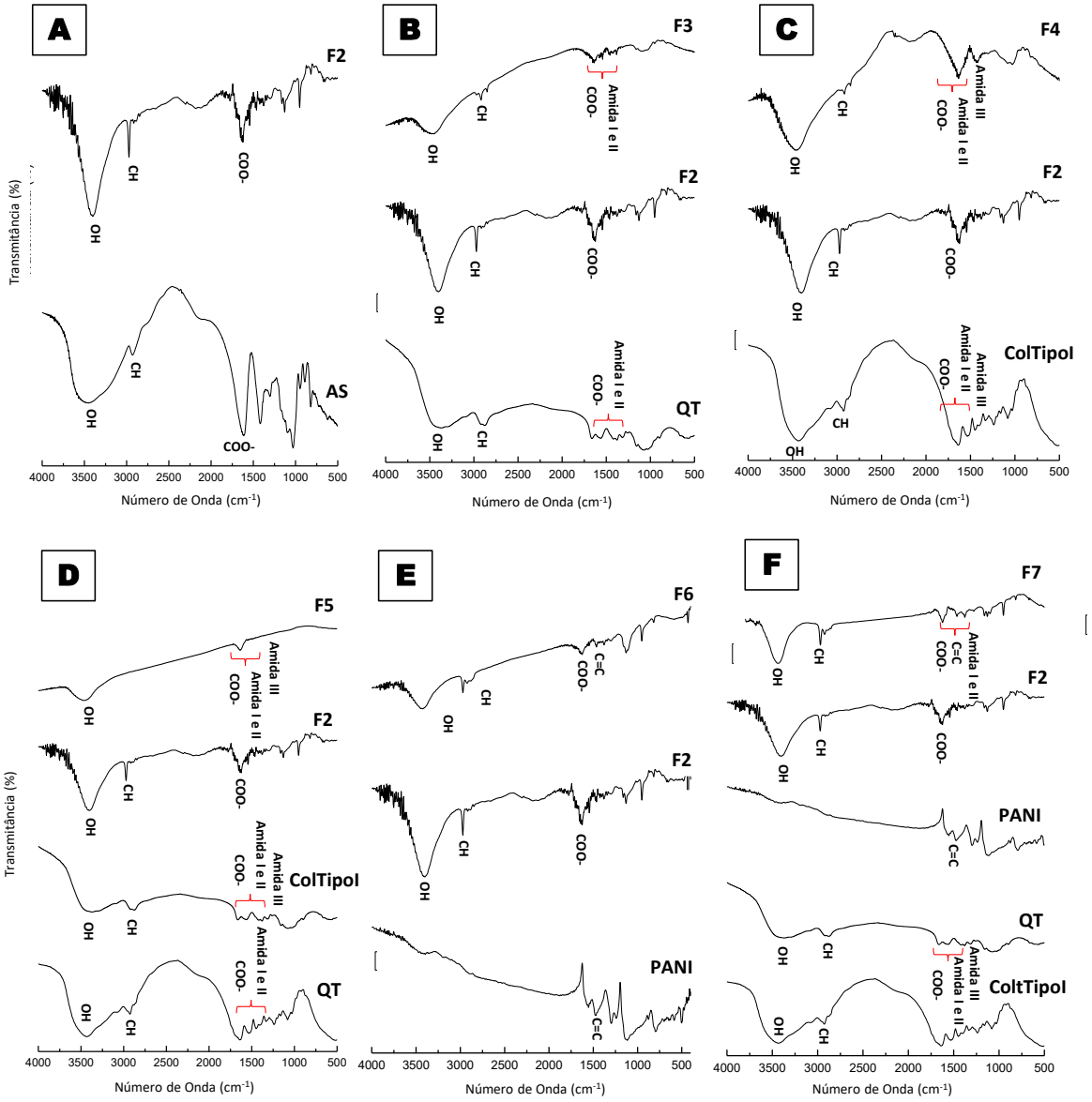
cadeia do AC. Esse evento confirma que ocorreu interação molecular ordenada pela geleificação ionotrópica do polissacarídeo (AS) com íons de Ca^{2+} (ABULATEEFEH; TAHA, 2015).

Devido à presença de outros compostos e diferenças nas interações eletrostáticas (QT. ColTipoI e PANI) a temperatura de clivagem variou entre 191ºC (F2-AC) e 215ºC (F4 – AC:ColTipoI). Resultado semelhante foi observado por Abullateefeh e Taha (2015) ao obterem micropartículas de AC. Além disso, a reticulação com Ca^{2+} e incorporação de outros polímeros (QT, ColTipoI e PANI) levou a um deslocamento da temperatura de degradação das microesferas quando comparadas as matérias primas, indicativo do aumento da resistência do alginato à oxidação térmica.

5.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Com a finalidade de ilustrar a interação intermolecular entre os componentes das esferas poliméricas, medida por espectroscopia de FTIR foi realizada (Figura 18 – Paineis A -F).

Figura 18 - Espectros FTIR do AS e F2 (A) - QT, AS F2 e F3 (B) - AS, ColtTipoI F2 e F4 (C) - AS, ColTipoI, QT, F2 e F5 (D) - AS, PANI, F2 e F6 (E) - AS, ColtTipoI, QT, PANI, F2 e F7 (F)



Fonte: Elaboração própria

Legenda: **AS** – Alginato de sódio puro, **QT** – Quitosana pura, **ColTipoI** – Colágeno tipo I puro, **F2** – Microesferas de alginato de cálcio ($CaCl_2$ pH 5,00), **F3** – Microesferas de alginato de cálcio + quitosana, **F4** – Microesferas de alginato de cálcio + colágeno tipo I.

As bandas características do AS (Figura 18 - painel A) referente ao número de ondas entre 3330 - 3414 cm^{-1} (OH), 2929 cm^{-1} (CH) e 1653 cm^{-1} (COO-) estão presentes nas esferas de AC (F2) (SAHA; RAY, 2013; FLORES-GARAY et al., 2016). Para as microesferas F3 (Figura 18 - painel B) as bandas características do AS estão presentes, apresentando deslocamento em 3448 cm^{-1} (OH), 2920 cm^{-1} (CH) e 1645 cm^{-1} (COO-) e as bandas características da QT referente ao número de ondas 1640 cm^{-1} (Amida I), 1564 cm^{-1} (Amida II) estão presentes, apresentado um

deslocamento apenas no número de ondas referente ao grupamento químico C=O (1073 cm^{-1}) (YUE et al., 2015).

Para as microesferas F4 (painel C) as bandas características do AS estão presentes, apresentando deslocamento em 3441 cm^{-1} (OH), 2918 cm^{-1} (CH) e 1645 cm^{-1} (COO-) e as bandas características do ColTipoI referente ao número de ondas 1639 cm^{-1} (Amida I), 1543 cm^{-1} (Amida II) estão presentes, apresentado um deslocamento apenas no número de ondas referente ao grupamento químico Amida III (1267 cm^{-1}) (ISWARIYA; POORNIMAVELSWAMYA; PARAMASIVAN, 2016).

Para as microesferas F5 (Figura 28 - painel D) as bandas características do AS apresentara deslocamento para o número de ondas em 3441 cm^{-1} (OH) e 1645 cm^{-1} (COO-) estão presentes, banda referente ao número de ondas 2929 cm^{-1} (CH) estava ausente.

Para as microesferas F6 (Figura 18 - painel E) as bandas características do AS estavam presentes, apresentando deslocamento apenas para o número de ondas correspondente ao grupamento OH (3435 cm^{-1}). As bandas características 1572 cm^{-1} e 1491 cm^{-1} (C=C) referente ao anel anilquinona e benzenóide da PANI estavam presentes.

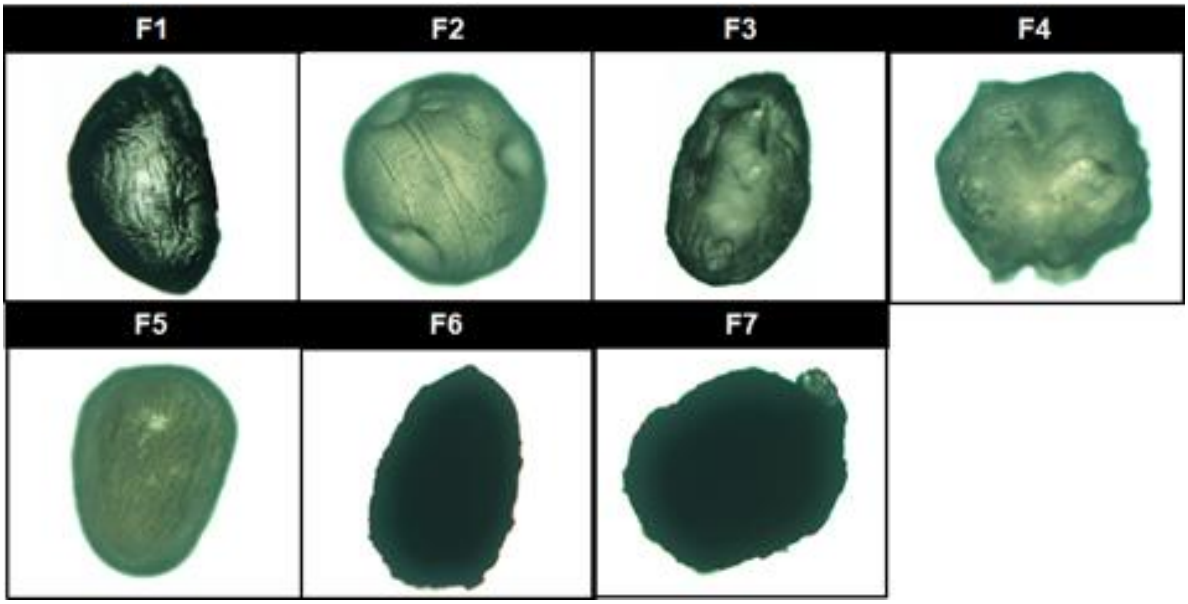
Para as microesferas F7 (Figura 18 - painel F) as bandas características do AS estavam presentes, apresentando deslocamento apenas para o número de ondas 3441 cm^{-1} (OH). As bandas características aos grupamentos Amida I e Amida II da QT e do ColTipoI aparecerem no mesmo número de ondas (1641 cm^{-1} e 1546 cm^{-1}), respectivamente, sendo que o grupamento Amida III (1267 cm^{-1}) característico do ColTipoI estava ausente. Os resultados apresentados pelas microesferas F7 confirmam a incorporação da QT, ColTipoI e PANI, demonstrando que o processo escolhido para a obtenção de microesferas otimizadas com esses biomateriais foi eficiente.

Outro evento observado na análise de FTIR é que ocorreu a diminuição na intensidade dos picos referente os grupamentos COO- (1653 cm^{-1}), Amida I (1640 cm^{-1}) e Amida II (1564 cm^{-1}) das microesferas que contém QT (F3, F5 e F7) quando comparado ao das microesferas sem QT (F4), confirmando que ocorreu a ligação iônica da QT com o AS (HAMMAN, 2010).

5.2.4 Avaliação do aspecto morfológico das esferas obtidas por microscopia óptica

A Figura 19 apresenta o aspecto morfológico após secagem das microesferas (F1 – F7) obtido por microscopia óptica.

Figura 19 - Imagem fotográfica das microesferas F1- F7 com magnitude de 4x



Fonte: Elaboração própria

Legenda: **F1** – Microesferas de alginato de Calcio ($CaCl_2$ pH 7,25), **F2** – Microesferas de alginato de Calcio ($CaCl_2$ pH 5,00), **F3** – Microesferas de alginato de cálcio + quitosana, **F4** – Microesferas de alginato de cálcio + colágeno tipo I, **F5** – Microesferas de alginato de cálcio + colágeno Tipo I + quitosana, **F6** – Microesferas de alginato de cálcio + polianilina, **F7** – Microesferas de alginato de cálcio + colágeno Tipo I + quitosana + polianilina.

Os resultados mostram que as microesferas F2, F4 e F7 apresentaram formato mais esférico (Figura 19). No entanto, a incorporação do ColTipoI, QT e PANI nas microesferas F2 apresentaram mudança para formato elíptico, respectivamente para as microesferas F3, F5 e F6. As microesferas F2 e F5 apresentaram aspecto mais liso e com uniformidade em sua superfície quando comparadas as microesferas F3 e F4 que apresentaram irregularidades em sua superfície.

Nas microesferas F5 a interação eletrostática do AS e QT formou uma esfera com superfície uniforme, conforme demonstrado na Figura 19. Esse resultado sugere que há um equilíbrio entre as unidades COO- e NH_3^+ desses polímeros. A formação da microesfera demonstra que o Ca^{2+} foi incorporado com sucesso nos

grupamentos ácido α-L-gulurônico (G), conforme descrito por VENKATESAN; BHATNAGAR; KIM (2014).

A Tabela 4 apresenta o diâmetro das microesferas F1-F7. A microesfera F3 foi a que apresentou menor diâmetro (160,53 ± 15,23 µm) e a microesfera F6 apresentou o maior diâmetro (296,93 ± 24,65 µm). No entanto, as microesferas F3, F4 e F7 não apresentaram diferença estatística (p>0,5) entre elas e para as microesferas F1, F2, F5 e F6 não há diferença estatística (p>0,5).

Tabela 5 - Diâmetro das microesferas F1 – F7

MICROESFERAS	DIÂMETRO (µm)
F1	$264,07 \pm 18,09^{ab}$
F2	$242,10 \pm 8,71^{ab}$
F3	$160,53 \pm 15,23^{c}$
F4	$171,06 \pm 43,19^{c}$
F5	$256,07 \pm 19,63^{ab}$
F6	$296,93 \pm 24,65^{a}$
F7	$225,80 \pm 19,63^{bc}$

Fonte: Elaboração própria

Legenda: **F1** – Microesferas de alginato de Calcio ($CaCl_2$ pH 7,25), **F2** – Microesferas de alginato de Calcio ($CaCl_2$ pH 5,00), **F3** – Microesferas de alginato de cálcio + quitosana, **F4** – Microesferas de alginato de cálcio + colágeno tipo I, **F5** – Microesferas de alginato de cálcio + colágeno Tipo I + quitosana, **F6** – Microesferas de alginato de cálcio + polianilina, **F7** – Microesferas de alginato de cálcio + colágeno Tipo I + quitosana + polianilina.

As letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias dos valores (p>0,05) *(n=3).* Os demais resultados são estatisticamente diferentes.

O tamanho da gota, massa molar, viscosidade da dispersão de AS, bem como a distância do bico ejetor da solução reticulante influenciam o tamanho das microesferas (SUGAWARA; IMAI; OTAGIRI, 1994). Como os parâmetros de distância do bico ejetor, tamanho da gota e massa molar do AS foram os mesmos durante a preparação das microesferas, os diferentes tamanhos de esferas obtidos

estão relacionados às interações eletrostáticas formadas entre os polímeros AS, QT e ColTipoI.

Microesferas de tamanho inferiores a 200 µm pode diminuir a infiltração celular e interferir no processo de sinterização para obtenção dos Scfs (RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2006). Gupta et al. (2017) consideram que o diâmetro mais adequado para as microesferas deve variar entre 200 µm – 300 µm, diferente do observado por Shalumon et al. (2016) que sugerem que microesferas com diâmetro entre 250 µm – 500 µm podem gerar tamanho de poros ideais para a infiltração e interação celular (SHALUMON et al., 2016; GUPTA et al., 2017). Ribeiro e colaboradores (2006) obtiveram Scf com poros de aproximadamente 40 µm a partir de microesferas com diâmetro entre 513 µm – 792 µm. Diante do exposto por estes autores podemos avaliar que as microesferas obtidas apresentam dimensões favoráveis para a obtenção de Scf injetáveis destinados a regeneração tecidual cardíaca.

5.2.5 Seleção das Amostras

As microesferas foram avaliadas pelas propriedades físico químicas de DSC e FTIR e pelas características morfológicas e de diâmetro. A análise dos resultados mostram que as microesferas F6 e F7 apresentaram aspectos físicos químicos de DSC e FTIR e aspectos morfológicos e de diâmetros adequados para obtenção de Scf microparticulados. Por conterem PANI são potencialmente condutoras de potencial elétrico, desta forma, foram selecionadas para a avaliação da capacidade de condução elétrica e avaliação por MEV.

5.2.6 Capacidade de condutividade do impulso elétrico

A Tabela 6 mostra os resultados da condutividade do impulso elétrico avaliada nas microesferas F2, F6 e F7. Ao observarmos os resultados as microesferas F6 apresentaram uma condutividade de $2{,}63.10^{-3} \pm 1.10^{-3}$ e $3{,}28.10^{-3} \pm 2.10^{-3}$ S/cm e as microesferas F7 apresentaram uma condutividade de $1{,}32.10^{-3} \pm 1.10^{-3}$ e $1{,}74.10^{-3} \pm 2.10^{-3}$ S/cm, respectivamente para 10 mg e 20 mg de microesferas. Resultados semelhantes de condutividade do impulso elétrico foi encontrado por Qazi et al. (2014) que obteve uma condutividade $1{,}29.10^{-3} \pm 1.10^{-3}$ S/cm em filmes de poly(glycerol-sebacate) contendo 15% PANI (QAZI et al., 2014). Valor de condutividade do impulso elétrico diferente foi obtido por Martins et al.

(2014), ao desenvolverem Scf de quitosana-carbono. Eles avaliaram a condutividade do material seco que ficou em 0,25 ± 0,09 S/cm e quando hidratado a condutividade foi para 0,04 ± 0,02 S/cm.

Tabela 6 - Avaliação da capacidade eletrocondutiva das microesferas F6 e F7, *(n=3).*

Scaffold	**F2**		**F6**		**F7**	
	10 mg	20 mg	10 mg	20 mg	10 mg	20 mg
Condutividade (S/cm)	$1{,}41.10^{-5} \pm 1.10^{-5}$	$1{,}63.10^{-5} \pm 2.10^{-5}$	$2{,}63.10^{-3} \pm 1.10^{-3}$	$3{,}28.10^{-3} \pm 2.10^{-3}$	$1{,}32.10^{-3} \pm 1.10^{-3}$	$1{,}74.10^{-3} \pm 2.10^{-3}$

Fonte: Elaboração própria

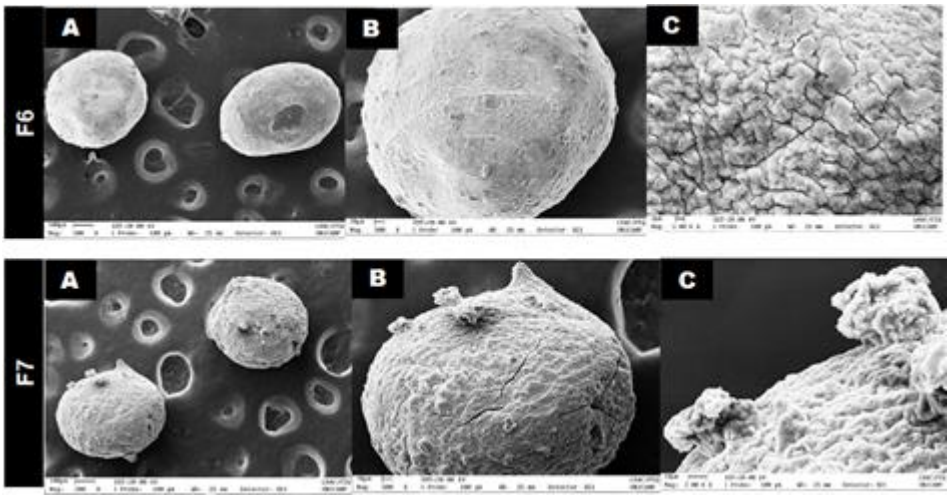
A incorporação da PANI nas microesferas permitiu que ocorresse condutividade do impulso elétrico quando estas estavam em contato com água ultrapura. Esse resultado era esperado, pois Scf formado por fibras poliméricas e polianilina permitiu a condução de estímulo elétrico pela extensão do dispositivo. Estudo realizado por Borriello et al. (2011) demonstrou que o estímulo elétrico gerado por dispositivos biológicos favoreceu a diferenciação das células mesenquimais em cardiomiócitos (BORRIELLO et al., 2011).

As células cardíacas são conectadas entre si pelas chamadas junções *gap* que formam um canal adjacente que permite o fluxo dos impulsos elétricos gerado pelos íons. Devido a essas conexões o sinal elétrico é propagado para todo o músculo cardíaco permitindo que ocorra a contração (sístole) e diástole cardíaca (KAISER; COULOMBE, 2015). Os resultados obtidos são promissores para favorecer a propagação da condutividade do impulso elétrico entre cardiomiócitos, pois segundo Roberts-Thomson et al (2009) a condutividade do miocárdio varia de $1{,}6.10^{-3}$ S/cm e $5{,}5.10^{-3}$ S/cm. Quando comparamos a condutividade do impulso elétrico apresentada em 10 mg de microesfera para 20 mg foi observado que ocorreu na eletrocondutividade de 24,7% para as microesferas F6 e de 31,9% para as microesferas F7. A análise dos resultados mostra que o aumento da condutividade não foi proporcional ao aumento da massa de microesferas.

5.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura das microesferas eletrocondutivas

Na Figura 20 mostra o aspecto morfológico das microesferas contendo PANI (F6 – F7) nos aumentos de 200 x, 500 x e 2000 x obtidas por MEV.

Figura 20 – Microscopia de varredura eletrônica (MEV) dos microesferas F6 e F7 com magnitude de 200 x (A), 500 x (B) e 2.000 x (C).



Fonte: Elaboração própria

Legenda: **F6** – Microesferas de alginato de cálcio + polianilina, **F7** – Microesferas de alginato de cálcio + colágeno Tipo I + quitosana + polianilina.

Os resultados mostram o aparecimento de superfície lisa ou irregular na microesfera F7 (Painel C). Em meio ácido (abaixo do ponto isoelétrico) os grupamentos amino (NH_3^+) presentes na estrutura do ColTipoI ficam expostos. No entanto, o número de grupamentos amino disponíveis é maior (3 grupos) do que os da QT (2 grupos), isso faz com que a interação eletrostática com os grupamentos COO- do alginato não seja equilibrada, o que justifica o aparecimento de superfície irregular nas microesferas que contém AC-ColTipoI.

Outra hipótese é que o aparecimento de superfície irregular na microesfera F7 pode estar relacionado ao pH do meio reacional. Os resíduos ionizados ao longo da cadeia do colágeno regulam a estabilidade da tripla hélice, sendo que a exposição dessa fração da cadeia é dependente do pH e participam das interações eletrostáticas com outros polímeros, como a QT e AS. Cabe ressaltar que os sais, como o $CaCl_2$, presente no meio reacional se ligam ao colágeno e também pode afetar as interações eletrostáticas (LI et al., 2009). O $CaCl_2$, como agente reticulante, influenciou as ligações eletrostáticas do ColTipoI com o AS. Das e Senapati (2008) observaram a mudança da superfície uniforme lisa para rugosa em microesferas de AC, após o aumento da concentração dos componentes que foi incorporado e se acumulou na superfície das microesferas (DAS; SENAPATI, 2008).

5.3 *Scaffold* laminar

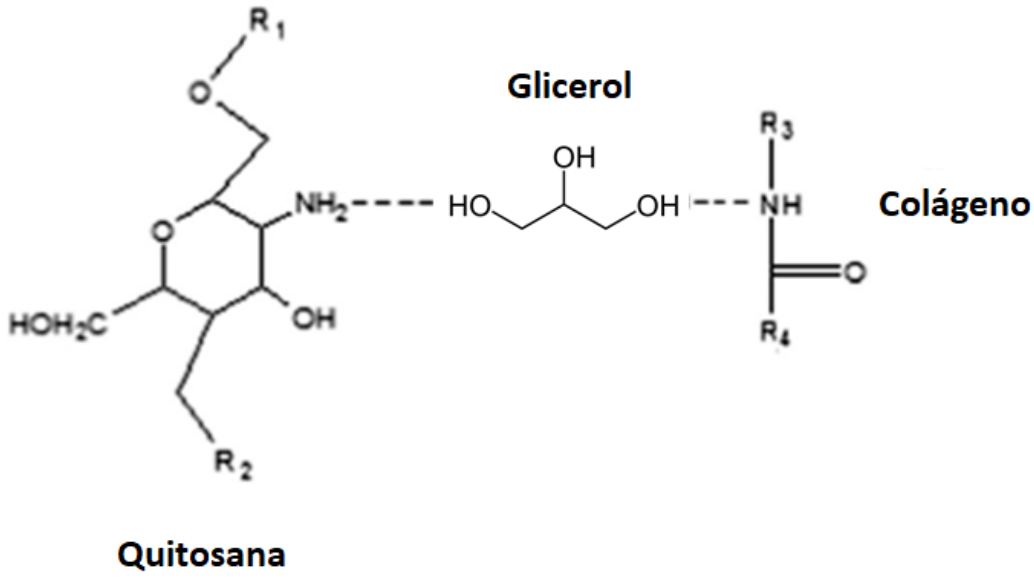
Para a obtenção dos Scf a dispersão de ColTipoI-QT permaneceram sob refrigeração durante 24 h. A baixa temperatura contribui para o processo de geleificação do colágeno, formando estruturas ordenadas e estabilizadas por ligações de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Durante a geleificação as proteínas livres e desordenadas são alteradas para uma conformação helicoidal formando uma rede estruturada (NEKLYUDOV, 2003). Para o processo de extensão dos filmes foi necessário aquecer as dispersões poliméricas para que as mesmas ficassem em estado mais fluído e passíveis de serem estendidas. O aquecimento foi realizado em banho termostático com temperatura controlada, sendo mantida a 35ºC até que a dispersão se tornasse mais fluída. Em estudo realizado Bozec e Odlyha (2011) foi avaliadas a influência da temperatura na desnaturação do colágeno. As fibras foram aquecidas e posteriormente avaliadas em microscópio, foi observado que quando aquecidas a uma temperatura inferior a 58ºC as fibras permaneciam integras (BOZEC; ODLYHA, 2011). Desta forma, o aquecimento da dispersão de ColTipoI-QT não interferiu na formação das fibras de colágeno, os estudos de FTIR (Figura 24 – Painéis A e B) contribuiu com essa observação, pois os grupamentos característicos da tripla hélice do ColTipoI estavam presentes.

Neste estudo os Scf laminares foram produzidos com biopolímeros naturais ColTipoI e QT, utilizando a glicerol como plastificante e agente reticulante. Os biomateriais que compõem os Scfs além de contribuir para formar a estrutura tridimensional (3D) também influenciam as propriedades bioquímicas e biológicas do tecido nativo. O ColTipoI e QT são biomaterais muito utilizados na obtenção de Scfs para regeneração do tecido cardíaco. O ColTipoI compreende cerca de 80% da MEC cardíaca, desta forma, quando presentes na composição do Scf, fornecerá ambiente semelhante ao tecido cardíaco para fixação e crescimento celular dos cardiomiócitos. No entanto, Scf de ColTipoI apresentam baixo módulo de elasticidade e baixa resistência mecânica (DOMENECH et al., 2016). A incorporação da QT melhora a resistência mecânica, aumenta a capacidade de adesão celular e favorece a angiogênese (DOMENECH et al., 2016).

Estudo realizado por Grover et al. (2012) demonstrou que a reticulação do ColTipoI e QT utilizando carbodiimida reduziu a reatividade celular, pois a mudança química causada pelo reticulante orgânico diminuiu os sítios disponíveis para ligação

celular (GROVER et al., 2012). Neste estudo foi utilizado o glicerol como agente reticulante e plastificante do ColTipoI e QT. Essa escolha foi baseada no trabalho desenvolvido por Sionkowska, Kazmarec e Lewandowska que utilizaram ácido tânico, rico em grupamentos hidroxilas (OH), para realizar a ligação entre os grupamentos amina (NH_2) (ColTipoI e QT) quando dispersos em meio ácido . (SIONKOWSKA; KACZMAREK; LEWANDOWSKA, 2014). A Figura 21 apresenta a interação molecular entre o ColTipoI, QT e glicerol.

Figura 21 - Ligações de hidrogênio para formação do crosslinkg entre a quitosana, colágeno tipo I e glicerol.

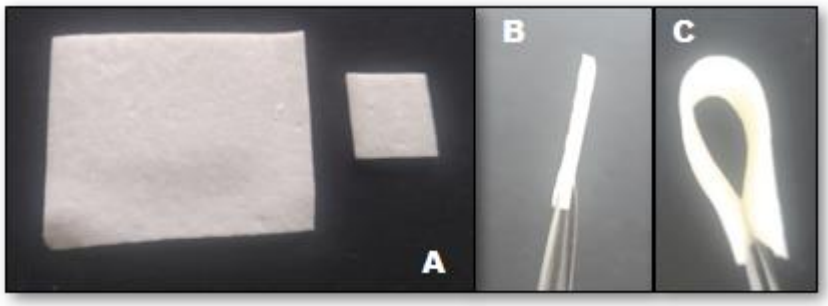


Fonte: Adaptado de Sionkowska, Kazmarec e Lewandowska (2014).

5.3.1 Características macroscópicas

A Figura 22 (painel A-C) mostra a aparência macroscópica do Scf laminar de Colágeno-Quitosana-Glicerol (ColTipoI-QT) obtidos pelo método de extensão (Figura 12) e liofilização. A análise dos resultados mostra que a técnica liofilização proporcionou a formação de Scf com estrutura macroscópia homogênea. Os extensores (Figura 11) favorecem a produção de Scf laminares com comprimento e largura que podem ser adaptadas de acordo com o tamanho da lesão tecidual, com limite até 15 cm. Outra vantagem apresentada pelo método de extensão é a possibilidade de produzir Scf com espessuras previamente projetadas (Figura 11) de acordo com a altura da vazão do extensor utilizado.

Figura 22 - Imagens fotográficas do Scf Laminar D3UT - (A) Imagem frontal, (B) imagem lateral e (C) Imagem do Scf flexionado.



Fonte: Elaboração própria

Os Scfs laminares obtidos com extensor de 1 mm (D1UT) apresentaram uma média entre 0,9 mm ± 0,1 e pelo extensor de 3 mm (D3UT) entre 1,3 mm ± 0,2, (*n=6*). Wales et al. (2003) observaram que na prática clínica há uma correlação entre o grau e velocidade de degeneração tecidual com a espessura da parede do tecido implantado. A avaliação dos resultados após a implantação de um Scf para regeneração vascular demostrou que um Scf mais espesso apresentou maior capacidade de regeneração do que um Scf com menos espessura (WALLES et al., 2003). Esses resultados contribuem para a possibilidade de se produzir Scf com espessuras adequadas para favorecer a regeneração tecidual, desta forma, a técnica de extensão é uma alternativa para a produção de Scf para regeneração cardíaca ou outros tecidos.

O Scf laminar apresentou a capacidade de ser flexionado sem que ocorra ruptura da amostra (Figura 22 – painel C). Essa propriedade pode facilitar o recobrimento da lesão do miocárdio, se moldando na região arredondada do coração. Os agentes plastificantes, como o glicerol, possuem baixa massa molar e são muito utilizados para melhorar as propriedades mecânicas dos filmes poliméricos, favorecendo as propriedades de flexibilidade e alongamento.

Após a adição de 5% de glicerol as dispersões poliméricas contendo ColTipoI e QT foram homogeneizadas com maior facilidade, o que indica que a concentração não ultrapassou a quantidade máxima para a formulação (DONHOWE; FENNEMA, 1993). A concentração máxima admissível de glicerol em dispersões poliméricas resulta em processo de exsudação e separação de fases, influenciando negativamente as propriedades do material.

5.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os ensaios térmicos realizados no DSC representados na Tabela 7 e Figura 23 permitiram identificar alterações nas variáveis termodinâmicas ocorridas durante as transformações físico-químicas induzidas pelo aquecimento das matérias primas e Scf laminares. Tendo em vista que os Scf laminares obtidos com extensor de 1 mm e 3 mm possuíam a mesma formulação, para esta análise foram utilizados os Scf laminares estendidos com extensor de 3 mm.

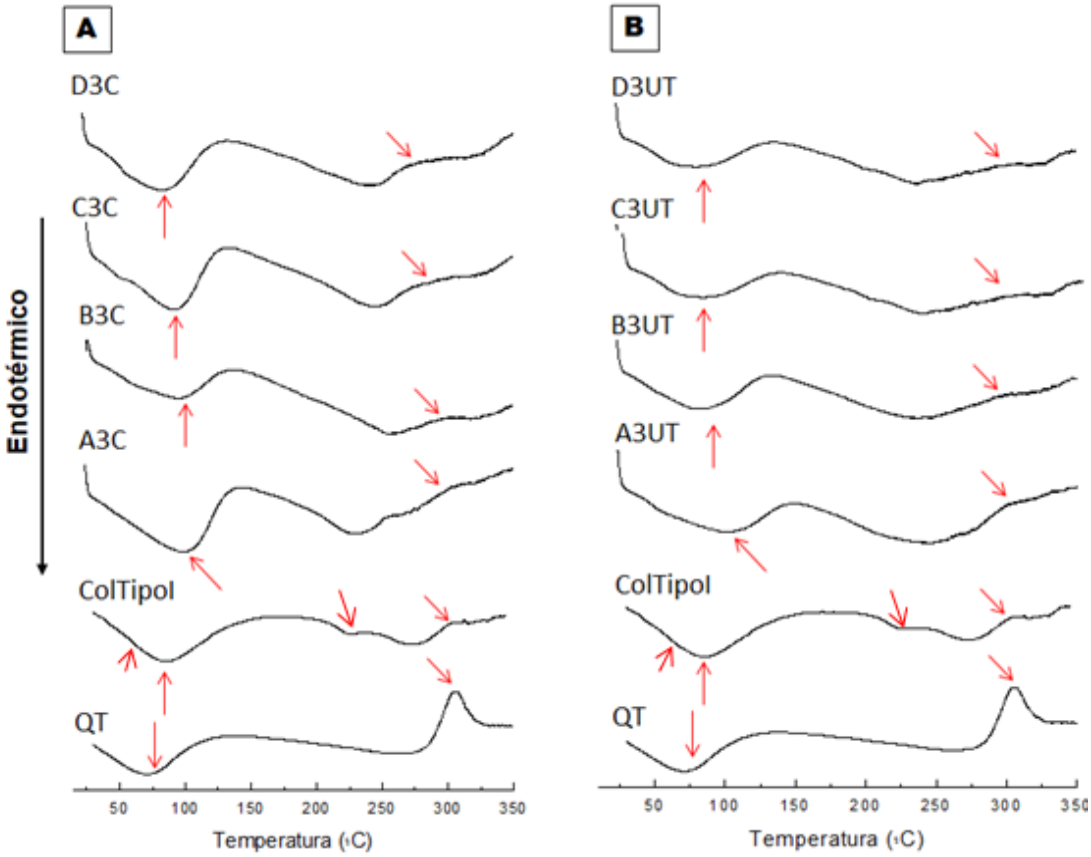
Tabela 7 - Temperatura referente à perda de água residual, variação de entalpia carbonização para matérias primas (ColTipoI e QT) e Scf laminares A3C, A3UT, B3C, B3UT, C3C, C3UT, D3C D3UT.

Material	Perda de água residual		Degradação
	Temp ºC	Entalpia J/g (ΔH)	Temp ºC
ColTipoI	85	-	314
QT	71	-	305
A3C	101	110	322
A3UT	98	102	317
B3C	90	69	312
B3UT	99	29	309
C3C	82	49	309
C3UT	93	28	310
D3C	82	42	305
D3UT	88	29	309

Fonte: Elaboração própria

Legenda: **QT** – Quitosana pura, **ColTipoI** – Colágeno tipo I puro, **C** – Processo de congelamento no congelador (-8 ºC) , **UT** – Processo de congelamento no ultrafreezer (-80ºC).

Figura 23 - DSC das matérias primas QT (painéis A-B); ColTipoI (painéis A-B); e Scf laminares A3C, B3C, C3C, D3C (A) e A3UT, B3UT, C3UT e D3UT (B).



Fonte: Elaboração própria

Legenda: **QT** – Quitosana, **ColTipoI** – Colágeno tipo I, **C** – Processo de congelamento no congelador (-8ºC) , **UT** – Processo de congelamento no ultrafreezer (-80ºC).

A presença de água nas matérias-primas e Scf laminares foi avaliado em balança analítica acoplada a sistema de secagem por radiação infravermelha variou entre 3,94% (QT) a 11,07% (Scf A3C).

Os termogramas de DSC apresentados na Figura 23 (painéis A-B) e Tabela 7 mostram que os primeiros eventos térmicos ocorreram nas temperaturas de 71ºC (QT) (paineis A-B) a 101ºC (A3UT) (painéis A-B) correspondendo à eliminação da água residual. A entalpia de mudança de estado líquido para vapor ocorre com o aumento da temperatura e pressão. O aumento da energia fornecida ao sistema resulta em um evento endotérmico. Os diferentes valores de entalpia das substâncias ocorrem devido em função da força de interações moleculares e das massas de seus componentes (GEROLA et al., 2010). Isso sugere que a QT influencia a retenção do teor de agua presente na estrutura (TONHI; PLEPLIS, 2002).

No termograma da QT Figura 23 (painéis A-B) o evento exotérmico em 305ºC está relacionado à degradação da amina (GUINESI; CAVALHEIRO, 2006). O ColTipoI Figura 23 (painéis A-B) apresentou um evento térmico com início em 40ºC (*onset*) e término em 120ºC (*endset*) referente a temperatura de desnaturação. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Tonhi e Pleplis (2002) que observaram que a desnaturação do ColTipoI ocorreu em 54º C. A desnaturação ocorreu devido ao aumento da temperatura que promove a quebra das ligações de hidrogênio e de algumas ligações cruzadas responsáveis por manter a estrutura proteica tridimensional (TONHI; PLEPLIS, 2002).

O evento térmico em 220ºC apresentado pelo ColTipoI (Figura 23 - painéis A e B) é referente a transição vítrea (*Tg*) dessa proteína, sendo que esse evento não foi observado nos Scf laminares. Esses resultados evidenciam que os materiais utilizados para a preparação dos Scf são miscíveis, pois no caso de blendas miscíveis, não ocorre evento de *Tg* já que as ligações intermoleculares favoráveis ocorrem entre os dois materiais. Nesse tipo de blenda, os polímeros dispersos ao acaso e as interações intermoleculares favoráveis provavelmente ocorrem entre os dois componentes da blenda (BARRETO LUNA et al., 2015). A formação de ligações cruzadas no ColTipoI estabiliza a tripla hélice do colágeno, alterando a *Tg* do material (CALDERON et al., 2010). A incorporação do glicerol e QT favoreceu a estabilidade da tripla hélice pela formação de ligações intermoleculares como demonstrado nos resultados do FTIR (Figura 23 – painéis A-B). O glicerol funciona como um crioprotetor de proteínas, evita que durante o processo de congelamento ocorra a desnaturação da proteína. Essa proteção evita que ocorra alterações conformacionais na cadeia da proteína, favorecendo a estabilidade da estrutura proteica (TSAI; NEUMANN; BELL, 2000).

A capacidade calorífica e a mudança de fase são eventos térmicos observados durante a medida de variação de entalpia da amostra. A variação de entalpia (ΔH) é dada pela diferença entre a temperatura da amostra (T*onset*) e a temperatura da referência (T*endset*) (BERNAL et al., 2002). A entalpia de mudança de estado líquido para vapor ocorre com o aumento da temperatura e pressão, o aumento da energia fornecida ao sistema resulta em um evento endotérmico. Os diferentes valores de entalpia das substâncias ocorrem em função da força de interações moleculares e das massas de seus componentes (GEROLA et al., 2010). A partir dos resultados analisados é possível observar na Tabela 7 que os Scf A3C e

AU3T apresentaram maior valor de ΔH, respectivamente, 110 J/g e 102 J/g. Esse resultado sugere que amostras com maior teor de QT tendem a apresentar maior número de ligações intermoleculares com a molécula de água, como observado por Tonhi e Pleplis (2002).

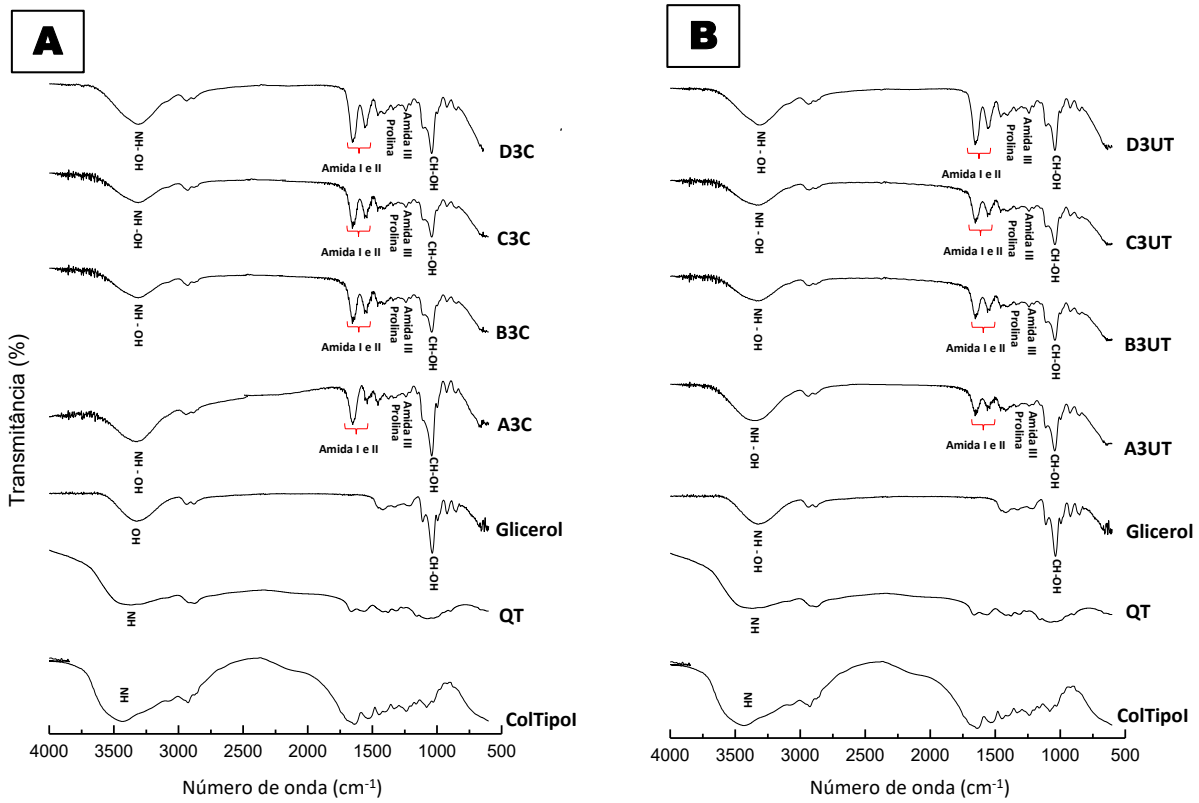
Picos de degradação térmica (Tabela 7 e Figura 23) ocorreram em 314ºC (ColTipoI) , 305ºC (QT), 322ºC (A3C), 317ºC (A3UT), 312ºC (B3C), 309ºC (B3UT), 309ºC (C3C), 309ºC (C3UT), 305 ºC (D3C) e 309ºC (D3UT). As temperaturas de degradação do ColTipoI, QT e Scf ficaram próximas. Para o ColTipoI essa temperatura está relacionada a perda das ligações de hidrogênio e, consequentemente, perda da estrutura terciária dessa proteína. No entanto, esse fenômeno é reversível se a proteína for hidratada (LEÓN-MANCILLA et al., 2016).

Os resultados obtidos no ensaio de DSC mostraram que a temperatura de congelamento influenciou o valor Entalpia J/g (ΔH). A necessidade de maior energia para retirar a água residual está relacionada ao tamanho de cristais formados pelo congelamento. A menor temperatura de congelamento é responsável por formar cristais de gelo com melhor organização espacial, o que foi evidenciado na imagem obtida por MEV (Figuras 25 e 26) que será discutida a seguir, exigindo do sistema o gasto de mais energia para realizar a sublimação do líquido contido entre as cadeias poliméricas.

5.3.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 24 (painéis A-B) mostra as interações intermoleculares entre as matérias primas e Scf laminares. Tendo em vista que os Scf laminares obtidos com extensor de 1 mm e 3 mm possuíam a mesma formulação, para esta análise foram utilizados os Scf laminares estendidos com extensor de 3 mm.

Figura 24 - Espectros FTIR das matérias primas ColTipoI (painéis A-B); QT (painéis A-B); Glicerol (paineis A-B) e Scf laminares A3C, B3C, C3C, D3C (A) e A3UT, B3UT, C3UT, D3UT (B).



Fonte: Elaboração própria

Legenda: **QT** – Quitosana pura, **ColTipoI** – Colágeno tipo I puro, **C** – Processo de congelamento no congelador (-8ºC), **UT** – Processo de congelamento no ultrafreezer (-80ºC).

O ColTipoI é uma proteína formada basicamente pelos aminoácidos prolina, hidróxiprolina e glicina. A partir da análise dos resultados foi possível verificar que a banda característica do ColTipoI referente ao número de ondas em 1240 cm^{-1} (Amida III) está presente em todos os Scf laminares, a banda da Amida III é complexa, consistindo de componentes do alongamento C – N e N – H na flexão de planos das ligações amídicas (ISWARIYA et al., 2016). Os picos característicos dos grupamentos Amida I (referente ao alongamento da carbonila) e Amida II (ligação HN-H) da QT (1645 cm^{-1} e 1562 cm^{-1}) e ColTipoI (1651 cm^{-1} e 1556 cm^{-1}) (YUE et al., 2015; ISWARIYA et al., 2016) aparecem sobrepostos no número de onda 1558 cm^{-1} para Amida I e 1654 cm^{-1} para Amida II para todos os Scf laminares.

As bandas características do glicerol estão presentes nos número de ondas 1125 cm^{-1} (CH-OH), 930 cm^{-1} (C-O) (LÓPEZ-DIAS et al., 2018). Os números de ondas em 3321 cm-^{1}(OH) do glicerol, 3421 cm^{-1} (NH) da QT e 3419 cm-1 (N-H) do ColTipoI aparecem sobrepostos no número de onda 3385 cm^{-1}, este resultado

sugere que ocorreu uma ligação entre os grupamentos OH do glicerol e NH_2 da QT e ColTipoI.

A presença da banda referente o número de onda em 1441 cm^{-1} nos Scf laminares mostra a integridade da tripla hélice do ColTipoI, sendo um indicativo que o processo de preparação do Scf preserva as estruturas desse biomaterial. A estrutura tripla hélice é rica em prolina e glicina, aminoácidos importantes para as propriedades biológicas e mecânicas do tecido nativo (UNGUREANU et al., 2015). A intensidade das bandas variou em todos os Scf laminares, à medida que o teor do colágeno aumenta a intensidade dos picos da amida I e amida II diminuem, principalmente para o congelamento a -80ºC (ultrafreezer).

A intensidade do pico referente ao grupamento amida III (ColTipo I) se manteve, com exceção dos Scfs C3C e C3UT. Isso sugere falta de estabilidade dessa amostra. A intensidade dos picos em determinado número de onda está relacionado ao número de ligações responsáveis pela absorção (SILVERTEINS; BASSLER; MORRILI, 2004). Quando em meio ácido os grupamentos amino da QT se tornam protonados (NH_3^+) favorecendo a interação eletrostática com os grupamentos COO- dos resíduos aspártico e glutâmico no ColTipoI.

Na Figura 24 (painéis A e B) é possível observar um aumento na intensidade das bandas referente ao COO- (1342 cm^{-1}) com a diminuição do teor da QT. Esse resultado sugere que além da interação dos grupamentos NH_2 da QT e ColTipoI com os grupamentos OH do glicerol, também ocorreu interações eletrostáticas com os grupamentos amino protonadas (NH_3^+) da QT. Nenhuma banda adicional foi identificada, o que sugere que não ocorreu a formação de um novo compósito.

A partir dos resultados analisados na espectroscopia FTIR (Figura 24, painéis A-B) associados aos termogramas (Figura 23, painéis A-B) é possível observar que não ocorreu à formação de um novo compósito, mas o processo de congelamento a -80ºC (ultrafreezer) favoreceu a formação das ligações eletrostáticas entre a QT-ColTipoI e glicerol.

5.3.4 Propriedades fisiomecânicas e módulo de elasticidade

Na Tabela 8 são apresentados os valores nominais e o tratamento estatístico das propriedades fisiomecânicas de resistência ao alongamento, perfuração,

flexibilidade e módulo de elasticidade para os Scf A1 (C-UT), B1 (C-UT), C1 (C-UT) e D1 (C-UT).

Tabela 8 - Propriedades fisiomecânicas e elasticidade dos Scf laminares A1 (C-UT), B1 (C-UT), C1 (C-UT) e D1 (C-UT), , *(n=3).*

Scaffolds	Alongamento (N s^{-1})	Perfuração (N s^{-1})	Flexibilidade (N s^{-1})	Elasticidade (kPa)
A1C	$2,64 \pm 0,1^{d}$	$2,08 \pm 0,3^{e}$	$1,59 \pm 0,1^{b}$	$372,02 \pm 6,7^{a}$
A1UT	$2,98 \pm 0,1^{d}$	$3,35 \pm 01^{d}$	$1,78 \pm 0,1^{b}$	$367,07 \pm 12,6^{a}$
B1C	$4,92 \pm 0,2^{c}$	$4,68 \pm 0,1^{c}$	$1,81 \pm 0,1^{b}$	$258,50 \pm 21,2^{bc}$
B1UT	$7,80 \pm 0,0^{ab}$	$5,04 \pm 0,2^{c}$	$2,57 \pm 0,1^{a}$	$235,33 \pm 11,9^{c}$
C1C	$6,35 \pm 0,1^{bc}$	$4,44 \pm 0,1^{cd}$	$1,49 \pm 0,2^{b}$	$349,23 \pm 22,6^{a}$
C1UT	$7,41 \pm 0,0^{ab}$	$4,96 \pm 0,1^{c}$	$1,70 \pm 0,1^{b}$	$311,32 \pm 26,6^{ab}$
D1C	$7,40 \pm 0,2^{ab}$	$6,15 \pm 0,1^{b}$	$1,63 \pm 0,2^{b}$	$299,98 \pm 19,9^{abc}$
D1UT	$8,55 \pm 0,2^{a}$	$7,66 \pm 0,2^{a}$	$2,80 \pm 0,1^{a}$	$251,65 \pm 17,1^{bc}$

Fonte: Elaboração própria

As letras iguais (para mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre as médias dos valores (p>0,05) *(n=3).* Os demais resultados são estatisticamente diferentes.

Na Tabela 9 são apresentados os valores nominais das propriedades fisiomecânicas resistência ao alongamento, perfuração, flexibilidade e módulo de elasticidade para os Scf A3 (C-UT), B3 (C-UT), C3 (C-UT) e D3 (C-UT).

Tabela 9 - Propriedades fisiomecânicas e elasticidade dos Scf laminares A3 (C-UT), B3 (C-UT), C3 (C-UT) e D3 (C-UT), *(n=3).*

Scaffolds	Alongamento (N s^{-1})	Perfuração (N s^{-1})	Flexibilidade (N s^{-1})	Elasticidade (kPa)
A3C	$3,79 \pm 0,2^{e}$	$2,97 \pm 0,1^{e}$	$1,50 \pm 0,2^{de}$	$371,16 \pm 6,7^{a}$
A3UT	$5,16 \pm 0,1^{d}$	$3,35 \pm 02^{e}$	$1,93 \pm 02^{cd}$	$362,72 \pm 14,6^{a}$
B3C	$6,08 \pm 0,1^{d}$	$6,90 \pm 0,2^{d}$	$2,07 \pm 0,2^{bc}$	$250,88 \pm 21,4^{cd}$
B3UT	$8,03 \pm 0,3^{c}$	$9,28 \pm 0,1^{c}$	$2,61 \pm 0,1^{a}$	$209,64 \pm 17,1^{d}$
C3C	$7,65 \pm 0,1^{c}$	$10,63 \pm 0,2^{c}$	$1,37 \pm 0,3^{e}$	$334,10 \pm 6,6^{a}$
C3UT	$9,62 \pm 0,1^{b}$	$12,50 \pm 0,1^{b}$	$1,89 \pm 0,1^{cd}$	$318,86 \pm 20,6^{ab}$
D3C	$7,98 \pm 0,2^{c}$	$13,17 \pm 0,1^{b}$	$2,55 \pm 0,1^{ab}$	$288,68 \pm 10,3^{bc}$
D3UT	$10,79 \pm 0,3^{a}$	$16,37 \pm 0,3^{a}$	$2,96 \pm 0,2^{a}$	$278,76 \pm 15,3^{bcd}$

Fonte: Elaboração própria

As letras iguais (para mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre as médias dos valores (p>0,05) *(n=3).* Os demais resultados são estatisticamente diferentes.

A análise dos resultados (Tabela 8) mostram, numericamente, que o Scf D1UT (8,55 ± 0,2 $N.s^{-1}$) apresentou maior a resistência ao alongamento (8,55 ± 0,2 $N.s^{-1}$) e Scf A1C apresentou menor resistência ao alongamento (2,64 ± 0,1 $N.s^{-1}$), sendo que os resultados são estatisticamente diferentes ($p < 0,5$). Os mesmo resultado foi observado para os Scfs A3C (3,79 ± 0,2 $N.s^{-1}$) e D3UT (10,79 ± 0,1 $N.s^{-1}$) (Tabela 9). A resistência ao alongamento está relacionada à força necessária para alongar o Scf até o ponto de ruptura das ligações entre as cadeias poliméricas. Esta medida fornece a quantidade máxima de estresse (resistência ao esforço longitudinal) que o material pode suportar antes de romper (STOPPEL et al., 2015). A maior resistência ao alongamento favorece o Scf para recuperação funcional e regeneração do tecido cardíaco isquêmico, pois poderá acompanhar o movimento de contração do coração durante a sístole sem que ocorra ruptura da estrutura.

Na Tabela 8 é possível observar que a força necessária para perfurar o Scf foi menor para A1C (2,08 ± 0,1 $N.s^{-1}$) e maior para D3UT (7.44 ± 0,1 $N.s^{-1}$), sendo que os resultados são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). O mesmo resultado foi observado para os Scf A3C (2,97 ± 0,1 $N.s^{-1}$) e D1UT (16,37 ± 0,1 $N.s^{-1}$) (Tabela 9). No entanto a resistência à perfuração do Scf A3C é estatisticamente igual ($p > 0,05$) a do Scf A3UT. Os ensaios de perfuração avaliam a capacidade de resistência do material quando submetido a uma determinada tensão até que ocorra a ruptura das cadeias poliméricas.

Para os ensaios de flexibilidade (Tabela 8 e 9) os Scfs D1UT e D3UT foram os que apresentaram maior propriedade de flexibilidade das cadeias poliméricas 2,80 ± 0,1 $N.s^{-1}$ e 2,96 ± 0,1 $N.s^{-1}$, respectivamente. No entanto a flexibilidade dos Scf D3UT, D3C e B3UT é estatisticamente igual ($p > 0,05$). A flexibilidade para os Scf D1UT e B3UT também é estatisticamente igual ($p > 0,05$). O ensaio de flexibilidade avalia a capacidade de um material sofrer uma deformação, quando submetido a uma tensão, sem que ocorra a ruptura das cadeias poliméricas. Neste ensaio, como no ensaio de elongação e perfuração, foi possível observar que a flexibilidade do Scf também aumenta em função do aumento da concentração de ColTipoI na formulação, com exceção dos Scf C1C, C1UT, C3C e C3UT (Tabela 8 e 9). As propriedades mecânicas estão relacionadas a interações intermoleculares entre os polímeros. Os Scf C (C-UT) foram preparados numa proporção de 3:1 (ColTipoI:QT),

essa proporção mássica pode ter interferido na ligação eletrostática entre os polímeros e o glicerol, não formando interação eletrostática estável e adequada.

A flexibilidade dos Scf também é influenciada pela temperatura de congelamento, sendo que os Scfs congelados a -80ºC (Tabela 8 e 9) apresentaram mais capacidade de flexibilidade. No entanto a flexibilidade dos Scfs C1C e C1UT é estatisticamente igual ($p > 0,05$) a dos Scfs A1C, A1UT, B1C, C1UT. A flexibilidade dos Scf C1UT e Scf C3C é estatisticamente igual ($p > 0,05$) aos Scfs A3C e AUT e o Scf C3UT apresenta flexibilidade estatisticamente igual ($p > 0,05$) a dos Scfs D3C e D3UT.

A análise dos resultados apresentados na Tabela 8 e 9 mostram que a resistência ao alongamento, perfuração e flexibilidade dos Scf aumentou em função do aumento da concentração do ColTipoI. Isso sugere que a interação intermolecular dos grupamentos amina do ColTipoI com os grupamentos OH do glicerol é maior do que o dos grupamentos COO- (ColTipoI) com os grupamentos amino protonados (NH_3^+) da QT. Esses resultados confirmam que o glicerol apresenta ação reticulante nessas formulações, como demonstrado no FTIR (Figura 28).

Também é possível observar nas Tabelas 8 e 9 que os Scf obtidos das dispersões poliméricas congeladas a -80ºC (ultrafreezer) apresentaram maior resistência ao alongamento, perfuração e flexibilidade. A Taxa de congelamento é um parâmetro importante no processo de liofilização. Durante o congelamento são definidos o tamanho e a forma de distribuição dos cristais de gelo no material, e neste momento que é definida a estrutura, forma e tamanho da amostra (TATTINI et al., 2006).

Os resultados sugerem que a força intermolecular entre as cadeias poliméricas dos Scf aumenta em função da concentração de colágeno e da temperatura de congelamento, sendo maior quando as dispersões poliméricas são congeladas a -80ºC. O controle da temperatura e pH do colágeno pode produzir rede de fibras de colágeno durante a polimerização, resultando em fibras com diferentes espessuras. O pH e temperatura menores resulta em fibras mais espessas, sendo que fibras com maior espessura podem ter maior resistência ao alongamento, favorecendo a mimetização de estruturas específicas *in vivo* (KAISER; COULOMBE, 2015b). É importante ressaltar que as propriedades fisiomecâncias de filmes poliméricos são diretamente afetadas pela natureza do biomaterial utilizado. As

condições de preparação do filme e aditivos utilizados como plastificantes e agentes reticulantes também influenciam no comportamento fisiomecânico dos filmes (CUQ et al., 1996).

O desenvolvimento de Scf que proporcione porosidade combinada com elasticidade e resistência fisiomecânicas adequadas ainda são parâmetros desafiadores para a engenharia de tecido. Em particular as propriedades de deformação do tecido cardíaco são propriedades fundamentais para beneficiar a regeneração do miocárdio infartado (NEAL et al., 2013). A Tabela 8 e 9 os valores nominais e o tratamento estatístico dos resultados do módulo de elasticidade (módulo de Young). O módulo de Young ou o módulo de elasticidade é um indicador da rigidez do filme, e quanto maior o módulo, mais rígido é o material (STOPPEL et al., 2015).

Após a análise dos resultados os Scfs que apresentaram menor módulo de elasticidade foram os Scfs B1UT (235,330 ± 11,9 kPa) (Tabela 8) e B3UT (209,639 ± 17,1 kPa) (Tabela 9). No entanto, a elasticidade do Scf B1UT é estatisticamente igual ($p > 0,05$) a dos Scfs B1C, D1C e D1T, e o Scf B3UT é estatisticamente igual ($p > 0,05$) aos Scf B3C e D3UT. Diferente dos resultados obtidos nas propriedades fisiomecânicas de resistência ao alongamento, perfuração e flexibilidade, o módulo de elasticidade não é influenciado pela concentração de colágeno. No entanto, a temperatura de congelamento a -80ºC proporcionou aos Scf menor módulo de elasticidade. Resultado semelhante foi obtido por Nascimento, Calado e Carvalho (2012) ao observarem que a melhoria do módulo de elasticidade e a interação entre os materiais da matriz polimérica é um parâmetro relevante para a melhoria da rigidez (NASCIMENTO; CALADO; CARVALHO, 2012).

Em virtude da sua constituição complexa o músculo do miocárdio traz desafios únicos para a engenharia de tecido. *In vivo*, o miocárdio nativo é constantemente expostos ao estresse mecânico cíclico e tensão na forma de extensão elástica e relaxamento. As características altamente elásticas do miocárdio são responsáveis pela diástole e sístole cardíaca. Para tanto, a rigidez do ventrículo esquerdo (VE) varia de 10-20 kPa durante a diástole e 200-500 kPa durante a sístole. Além de influenciar as propriedades mecânicas, a rigidez do material poderá afetar a ligação do fenótipo celular na estrutura porosa (KAISER; COULOMBE, 2015). A capacidade elástica apresentadas pelos Scf (Tabela 8 e 9) apresentam resultados adequados para serem utilizados na regeneração do tecido cardíaco.

Outro estudo que corrabora com os resultados de modulo de elasticidade obtidos neste estudo é de Parl et al. (2010). Os auotes desenvolveram Scf elastoméricos compostos por poly(glycerol-sebate), com módulo de elasticidade entre 200 e 250 kPa. Após implantação *in vivo,* houve redução na apoptose celular e aumento na expressão da proteína troponina I (PARK et al., 2012). Além disso, as propriedades de rigidez (módulo de elasticidade) de Scf laminares na forma de patch podem contribuir para limitar a remodelação do ventrículo esquerdo (VE), prevenir a dilatação e reduzir a apoptose dos cardiomiócitos (TAKAHASHI; YAMAMOTO; TABATA, 2005; SERPOOSHAN et al., 2013).

5.3.5 Capacidade de mucoadesão

Os resultados dos valores nominais e o tratamento estatístico da força máxima (Fmax) (N s^{-1}) necessária separar os Scfs A1 (C-UT), B1 (C-UT), C1 (C-UT), D1 (C-UT), A3 (C-UT), B3 (C-UT), C3 (C-UT) e D3 (C-UT) dos discos de mucina em função do tempo são apresentados nas Tabelas 10 e Tabela 11.

Tabela 10 – Capacidade de mucoadesão dos Scfs laminares A1 (C-UT), B1 (C-UT), C1 (C-UT) e D1 (C-UT), *(n=3)*.

	Força máxima (F_{max}) para separação (N s^{-1}) em função do tempo		
Scaffolds	60s	120s	180s
A1C	$1,63 \pm 0,1^{b}$	$2,56 \pm 0,2^{bc}$	$2,12 \pm 0,1^{c}$
A1UT	$2,35 \pm 0,1^{a}$	$2,54 \pm 02^{bc}$	$2,49 \pm 0,1^{b}$
B1C	$2,40 \pm 0,2^{a}$	$2,75 \pm 0,1^{abc}$	$2,45 \pm 0,1^{a}$
B1UT	$2,45 \pm 0,1^{a}$	$3,13 \pm 0,3^{a}$	$2,74 \pm 0,2^{a}$
C1C	$2,10 \pm 0,1^{a}$	$2,22 \pm 0,6^{c}$	$2,50 \pm 0,2^{b}$
C1UT	$2,35 \pm 0,1^{a}$	$2,93 \pm 0,1^{ab}$	$2,72 \pm 0,1^{ab}$
D1C	$2,34 \pm 0,1^{a}$	$2,61 \pm 0,1^{abc}$	$2,71 \pm 0,1^{ab}$
D1UT	$2,44 \pm 0,2^{a}$	$2,85 \pm 0,1^{ab}$	$2,65 \pm 0,3^{ab}$

Fonte: Elaboração própria

As letras iguais (para mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre as médias dos valores (p>0,05) *(n=3).* Os demais resultados são estatisticamente diferentes

Tabela 11 – Capacidade de mucoadesão dos Scfs laminares A3 (C-UT), B3 (C-UT), C3 (C-UT) e D3 (C-UT) *(n=3)*

	Força máxima (Fmax) para separação (N) em função do tempo		
Scaffolds	60s	120s	180s
A3C	$2,56 \pm 0,3^{ab}$	$2,12 \pm 0,1^{c}$	$2,62 \pm 0,2^{ab}$
A3UT	$2,73 \pm 0,1^{ab}$	$2,54 \pm 02^{bc}$	$2,49 \pm 0,1^{ab}$
B3C	$2,51 \pm 0,1^{ab}$	$2,40 \pm 0,2^{bc}$	$2,62 \pm 0,2^{ab}$
B3UT	$2,88 \pm 0,3^{a}$	$3,01 \pm 0,1^{a}$	$2,94 \pm 0,1^{a}$
C3C	$2,27 \pm 0,1^{b}$	$2,47 \pm 0,2^{bc}$	$2,38 \pm 0,1^{b}$
C3UT	$2,55 \pm 0,1^{ab}$	$2,69 \pm 0,1^{ab}$	$2,45 \pm 0,1^{b}$
D3C	$2,76 \pm 0,2^{ab}$	$2,83 \pm 0,1^{ab}$	$2,65 \pm 0,1^{ab}$
D3UT	$2,56 \pm 0,3^{ab}$	$2,72 \pm 0,1^{ab}$	$2,62 \pm 0,2^{ab}$

Fonte: Elaboração própria

As letras iguais (para mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre as médias dos valores (p>0,05) *(n=3).* Os demais resultados são estatisticamente diferentes

As Tabelas 10 e 11 mostram que a Fmáx de adesão em 60 s, numericamente, foi maior nos Scf B1UT e B3UT. No entanto, não houve diferença estatística (p > 0,05) entre os Scfs laminares da Tabela 10, com excessão do A1C, que diferiu do B1UT. Com relação aos Scfs da Tabela 11, a única diferenteça estatística foi encontrada entre B3UT e C3C.

No tempo de 120s, a Fmáx de adesão foi, numericamente, maior para os Scfs B1UT ($3,13 \pm 0,3$ N.s^{-1}) e B3UT ($3,01 \pm 0,2$ N.s^{-1}). No entanto, a Fmax de adesão para o Scf B1UT é estatisticamente igual (p>0,05) a dos Scf B1C, C1UT, D1C e D1UT. A Fmax de adesão do Scf B3UT não apresenta diferença estatística (p > 0,05) em relação á dos Scf C3UT, D3C e D3UT.

No tempo 180s, a Fmáx de adesão foi, numericamente, maior para os Scfs B1UT ($2,74 \pm 0,2$ N.s^{-1}) e B3UT ($2,94 \pm 0,2$ N.s^{-1}). No entanto a Fmáx de adesão do Scf B1UT é estatisticamente igual (p > 0,05) a dos Scf B1C, C1UT, D1C e D1UT. A Fmáx de adesão do Scf B3UT é estatisticamente igual a dos Scf A1C, A3UT, B3C, D3C e D3UT.

A análise dos resultados mostra que a Fmáx de adesão dos Scf não é influenciada pela concentração dos polímeros na formulação. No entanto os Scf obtidos pelo congelamento das dispersões poliméricas a -80ºC apresentaram valores nominais maiores. É possível observar que ocorreu um aumento na Fmáx do tempo de 60s para o tempo de 120s isso sugere que a Fmáx de adesão é dependente do tempo de contato do Scf com o disco de mucina. No entanto após 180s de contato ocorre uma pequena diminuição da Fmáx de adesão.

A mucoadesão pode ocorrer por um ou mais mecanismos: por ligações de natureza eletrostática ou por ligações de hidrogênio, por intumescimento ou aumento da viscosidade ou por difusão onde ocorre a interpenetração das cadeias poliméricas (SUKNUNTHA et al., 2011). A natureza catiônica da QT favorece a formação de ligações de hidrogênio e ligações eletrostáticas com substâncias carregadas negativamente, como a mucina ou outros polímeros (WAYS; LAU, 2018). Esta seria o mecanismo mais provável de mucoadesão apresentados pelos Scf laminares, devido à presença de QT nos Scf, no entanto, os resultados evidenciaram que a capacidade de mucoadesão não diminuiu em função da menor concentração da QT na formulação. Desta forma, a presença da QT no Scf laminar favorece a mucoadesão independente do teor utilizado nas diferentes proporções.

O mecanismo de intumescimento ou viscosidade também não se adequa aos Scfs, pois não se trata de material líquido. A análise dos resultados mostra que a mucoadesão dos Scf laminares ocorre pelo mecanismo de difusão, pois o aumento progressivo da Fmáx de adesão ocorreu em função do aumento do tempo de contato de 60s para 120s. Quando o material é colocado em contato com o muco ocorre a formação de ligações bioadesivas semipermanentes devido ao desenrolamento e consequente interpenetração das cadeias e entrelaçamento físico do polímero com as cadeias glicoproteicas do muco. A Fmáx aumenta com o grau de penetração das ligações bioadesivas, sendo que a força máxima de ligação será alcançada quando a profundidade de penetração for igual para o polímero e a glicoproteína do muco (SUKNUNTHA et al., 2011).

5.3.6 Seleção das amostras

De acordo com os resultados de DSC e FTIR e pelas propriedades fisiomecânicas e de mucoadesão. Os Scf B1C, B1UT, D1C e D1UT apresentaram maiorestabilidade físico químicas, boas propriedades fisiomecânicas e de

mucoadesão, e menor valor nominal no módulo de elasticidade, sendo este um fator determinante para o Scf com potencial para regeneração do músculo cardíaco. Diante disso, nesses Scfs as características de porosidade, interconectividade dos poros e anisotropia foram avaliados por µCt e MEV.

5.3.7 Microtomografia computadorizada (µCt)

As Tabelas 12 e 13 mostram a porosidade (%),volume de poros abertos (mm^3), poros fechados (%) e grau de anisotropia dos Scf laminares. O volume de poros abertos representa a interconectividade entre os poros dos *Scf,* as quais estão relacionadas ao percentual de poros fechados/abertos e o volume total de poros (mm^3).O resultado da porosidade dos Scfs laminares obtidos no extensor 1 mm realizados no µCT (Tabela 12) variou entre 56,94% (B1C) e 62,38 (D1UT), a interconectividade dos poros foi menor para B1C (2,22 mm^3) e maior para D1UT (6,02 mm^3), o percentual de poros fechados variou entre 0,15% (D1UT) e 0,27% (B1C) e o grau de anisotropia foi maior para D1UT (0,74755) e menor para B1C (0,48125). Para os Scfs laminares obtidos no extensor 3 mm realizados no µCT (Tabela 13) a porosidade variou entre 67,69% (D3C) e 76,50% (D3UT), a interconectividade dos poros foi menor para B3C (2,64 mm^3) e maior para B3UT (4,07 mm^3), o percentual de poros fechados variou entre 0,0% (D3UT) e 0,05% (B1C), o grau de anisotropia foi maior para D3UT (0,98732) e menor para B3C (0,58962).

Tabela 12 - Descrição da porosidade (%), poros fechados (%), volume de poros abertos (mm^3) e grau de anisotropia dos Scf laminares B1C, D1C. B1UT e D1UT

PROPRIEDADES	B1C	D1C	B1UT	D1UT
Porosidade (%)	56,94	57,49	57,02	62,38
Volume de poros abertos (mm^3)	2,22	2,48	2,37	6
Poros fechados (%)	0,27	0,22	0,27	0,15
Grau de anisotropia	0,48125	0,60510	0,63659	0,74755

Fonte: Elaboração própria

Tabela 13 - Descrição da porosidade (%), poros fechados (%), volume de poros abertos (mm-^{3}) e grau de anisotropia dos Scf laminares B3C, D3C. B3UT e D3UT

PROPRIEDADES	B3C	D3C	B3UT	D3UT
Porosidade (%)	67,89	63,97	70,72	76,50
Volume de poros abertos (mm^3)	2,64	3,10	4,07	2,82
Poros fechados (%)	0,06	0,00	0,05	0,00
Grau de anisotropia	0,58962	0,86783	0,69848	0,98732

Fonte: Elaboração própria

Os Scfs laminares obtidos pela temperatura de congelamento a -80ºC, apresentaram maior percentual de porosidade e grau de anisotropia. O processo de congelamento tem demonstrado que pode influenciar a formação de Scf com estrutura anisotrópica. Christine et al. (2016) desenvolveram Scf de característica anisotrópica compostos por gelatina e fibroína da seda congelando as dispersões poliméricas com nitrogênio. O rápido congelamento favoreceu a formação de uma estrutura anisotrópica. A µCt por transmissão de Raios X é uma técnica não destrutiva que avalia amostras na escala micrométrica, obtendo informações sobre a propriedade do material e geometria tridimensional em alta resolução. Os valores para o grau de anisotropia podem variar de 0 (indica que a estrutura é totalmente isotrópica) e grau 1 (indica que a estrutura é totalmente anisotrópica) (SILVA et al., 2014).

Anisotropia é a capacidade de propagação de sinais elétricos em todo o coração devido à linearidade da estrutura da fibra cardíaca, sendo responsável por contrações controladas e sincronizadas associadas com funcionalidade do coração saudável. O Scf para regeneração cardíaca deve ser, preferencialmente, anisotrópico para favorecer o alinhamento dos cardiomiócitos. Cardiomiócitos mal alinhados podem expandir na direção do tecido nativo, reduzindo a força e eficiência contrátil (HANG et al., 2010; BIAN; JACKMAN; BURSAC, 2014)[i]. Os Scf B1C, B1UT, D1C, D1UT, B3C, B3UT, D3C e D3UT apresentaram grau de anisotropia variado. Os Scf contendo maior teor de ColTipoI (B1UT, D1UT, D3C e D3UT) apresentaram maior grau de anisotropia. Os resultados mostram que o maior teor de ColTipoI nas formulações D (4:1-ColTipoI:QT) possibilitou uma maior interação com o glicerol, as

alterações eletrostáticas podem aumentar o diâmetro da fibrila de colágeno, e consequentemente interferir na estrutura da proteína (ACHILLI; MANTOVANI, 2010).

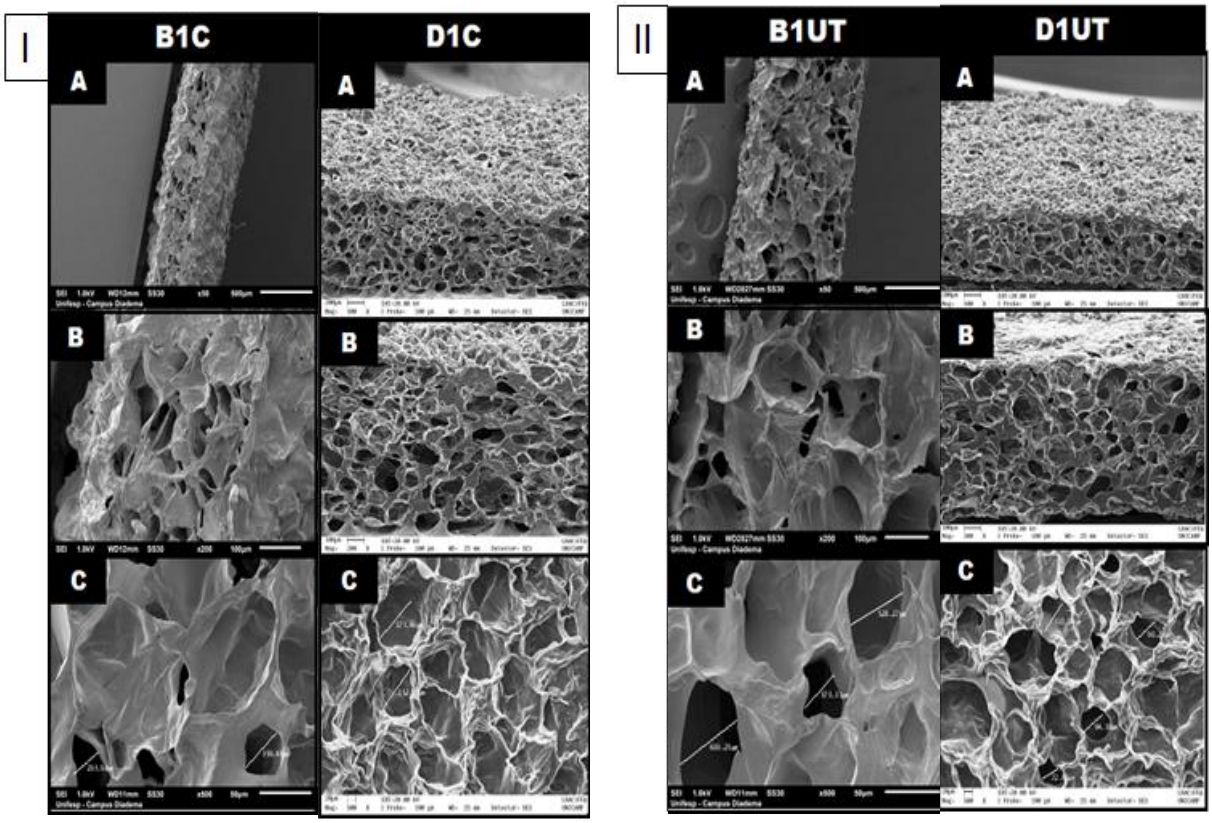
Durante o processo de obtenção dos hidrogeis de ColTipoI e QT os mesmos permaneceram sob refrigeração durante 24 h. A baixa temperatura contribui para o processo de geleificação do colágeno, formando estruturas ordenadas e estabilizadas por ligações de Van der Waals e por ligações de hidrogênio. Durante a geleificação as proteínas livres e desordenadas são alteradas para uma conformação helicoidal formando uma rede estruturada (NEKLYUDOV, 2003).

Pela análise dos resultados, podemos dizer que os Scf laminares B1C, B1UT, D1C, D1UT, B3C, B3UT, D3C apresentam estrutura isotrópicos e anisotrópicos, e o Scf D3UT apresenta uma estrutura anisotrópica. Os resultados obtidos mostram que os Scf laminares apresentam propriedades estruturais de porosidade e anisotropia adequadas para serem aplicados na regeneração do tecido cardíaco, em especial o Scf laminar D1UT e D3UT.

5.3.8 Microscopia de varredura eletrônica (MEV)

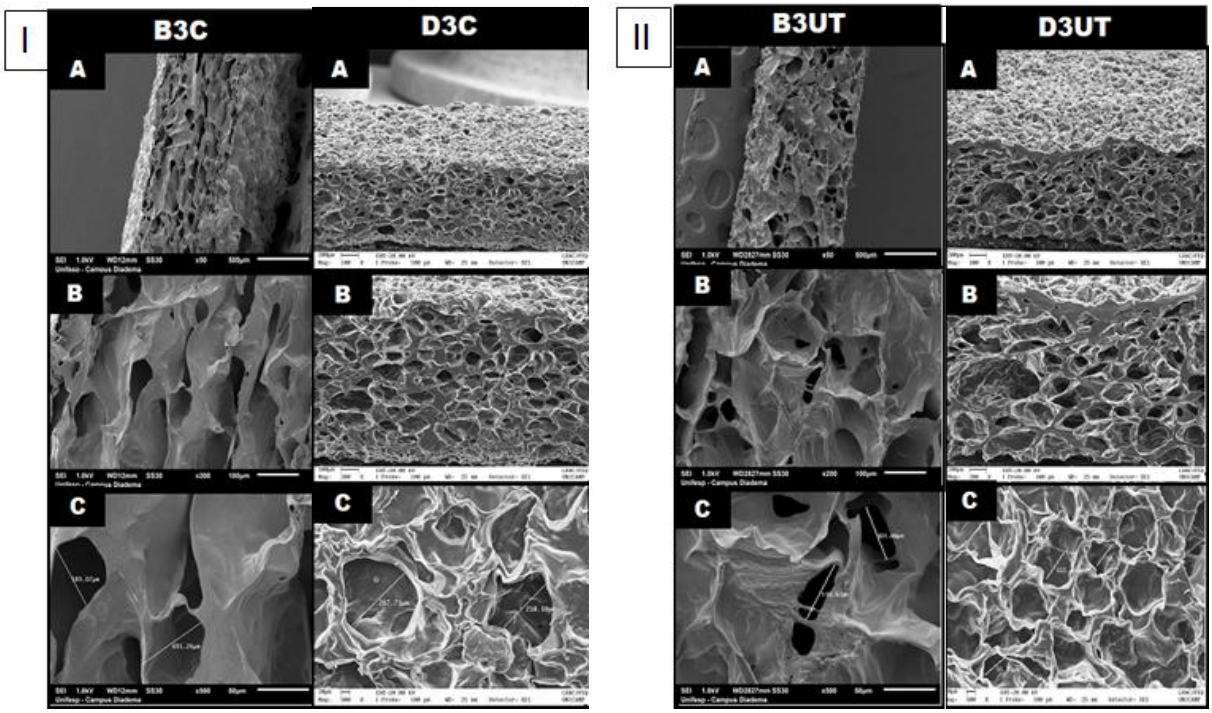
As Figuras 25 e 26 (Paineis I e II) mostram as imagens realizadas por microscopia de varredura eletrônica (MEV) dos Scfs laminares B1C, D1C, B3C, D3UT (painel I), B1C, D1UT, B3C e D3UT (painel II).

Figura 25 - Microscopia de varredura eletrônica (MEV) dos Scfs laminares B1C, D1C (painel I), B1UT e D1UT (painel II). Vista lateral – com magnitude de 100x (A), 200 x (B) e 500 x (C).



Fonte: Elaboração própria

Figura 26 - Microscopia de varredura eletrônica (MEV) dos Scfs laminares B3C, D3C (painel I) e B3UT e D3UT (painel II). Vista lateral – com magnitude de 100x (A), 200 x (B) e 500 x (C).



Fonte: Elaboração própria

É possível observar em todas as imagens que ocorreu formação de estrutura porosa tridimensional. Porém ao compararmos as imagens dos Scf B1C-D1C (Figura 25 – painel I) com as imagens dos Scf B1UT-D1UT (Figura 25 – painel II) é possível visualizar estrutura porosa formada com poros mais homogêneos distribuídos em toda a estrutura nos Scf D1C-D1UT. Os mesmos resultados são observados na Figura 26 – painéis I e II. Esses resultados sugerem que o aumento da concentração de ColTipoI na formulação dos Scf D1C, D1UT, D3C e D3UT favorece a formação de uma estrutura com poros mais homogeneamente distribuídos. Isto ocorre devido à formação de cristais de menor tamanho quando o hidrogel é congelamento mais rapidamente (-80ºC).

A porosidade e interconectividade dos poros apresentadas nas Figuras 25 - 26 e Tabela 13 é uma indicativo de que a formulação é adequada para obtenção de Scf e que o método utilizado foi capaz de formar estrutura porosa que beneficiará a acomodação adequada dos cardiomiócitos.

A Tabela 14 mostra a variação no tamanho dos poros dos Scf B1C, B1UT, B3C, B3UT, D1C, D1UT, D3C e D3UT, sendo que o Scf D1UT apresentou poros

com diâmetro menor (72,61 µm) e o Scf B3C apresentou tamanho de poro maior (589,07 µm).

Tabela 14 - Variação do diâmetro dos poros obtidos por MEV dos Scf B1C, B1UT, B3C, B3UT, D1C, D1UT, D3C e D3UT

Scaffold	**B1C** (µm)	**B1UT** (µm)	**B3C** (µm)	**B3UT** (µm)
Diâmetro dos poros	293,98 - 399,48	373,41- 619,25	589,07 - 691,21	559,87- 603,68
Scaffold	**D1C** (µm)	**D1UT** (µm)	**D3C** (µm)	**D3UT** (µm)
Diâmetro dos poros	128,06 – 173,46	72,61 – 113,19	218,19 – 267,71	93,85 – 113,76

Fonte: Elaboração própria

A análise dos resultados mostra que o tamanho dos poros foi maior para os Scf B1C, B1UT, B3C, B3UT o que sugere que a concentração de ColTipoI e QT presentes nos Scfs influencia a formação homogênea da estrutura porosa e tamanho dos poros. É possível observar que a espessura do Scf também foi um parâmetro que influenciou o tamanho dos poros. Os Scf com espessura menor apresentaram tamanho de poros menores. O tempo de congelamento mais rápido pode influenciar o tamanho dos cristais de gelo formados, fator que determina o tamanho dos poros. À medida que o gelo cresce, a fase sólida é empurrada para fora do sistema contínuo pelos cristais de gelo, ficando concentradas em áreas entre os cristais. Depois que o gelo é removido por sublimação, ocorre à formação de poros na região que anteriormente existiam os cristais de gelo (CHRISTINE et al., 2016).

O tamanho, a distribuição e a interconectividade dos poros são fatores críticos que determinam a transferência de massa de oxigênio e nutrientes para apoiar o crescimento vascular no Scf (COULOMBE et al., 2014). Poros com tamanho de 40 µm resultaram em maior densidade de vasos ocasionando a fibrose do local. Em contrapartida poros com tamanhos de 370 µm favoreceram o suprimento de oxigênio para proliferação dos cardiomiócitos e fibroblastos (RADISIC et al., 2006). Em estudo *in vivo*, o tamanho de poros > 250 µm favoreceu a angiogênese, dando origem a um número maior de microvasos (DRUECKE et al., 2004).

Os resultados observados no MEV contribuem para a melhoria das propriedades das fisiomecânicas e do modo de elasticidade, como já observado nas Tabelas 8 e 9 e de características morfológicas (Tabelas 12 e 13).

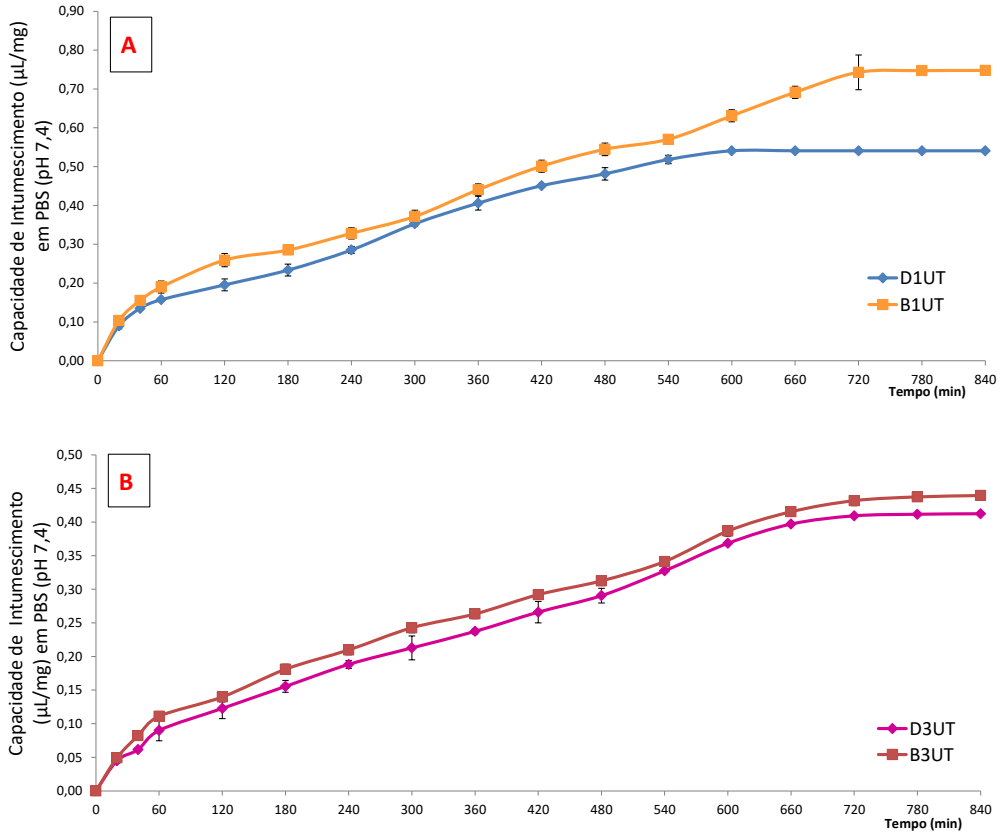
5.3.9 Seleção das amostras

A partir dos resultados de propriedades de porosidade, interconectividade dos poros e estrutura dos poros. Os Scfs B1UT, B3UT, D1UT e D3UT obtidos pelo congelamento das dispersões poliméricas a temperatura de -80ºC foram selecionados para a realização da análise de capacidade de intumescimento.

5.3.10 Capacidade de Intumescimento

A Figura 27 mostra a relação do volume de meio absorvido (µL/mg) em função do tempo. O ensaio de intumescimento foi realizado em PBS pH 7,4 durante 840 min. O sistema de intumescimento utilizado neste estudo permite que as moléculas do solvente permeiem gradualmente pela estrutura das cadeias poliméricas. A implantação do Scf na forma seca irá favorecer a infiltração lenta dos fluídos orgânicos. A infiltração lenta dos fluídos corpóreos utilizado neste estudo, permitirá a adaptação gradual da estrutura na região de implantação. A capacidade de absorção de água indica o nível de fluídos corpóreos que será absorvido pelo material Scf (LI et al., 2005; DAVIDENKO et al., 2010).

Figura 27 - Capacidade de Intumescimento dos Scf laminares B1UT - D1UT (A), B3UT – D3UT (B) em PBS pH 7,4. *(n=3)*



Fonte: Elaboração própria

Os resultados mostram que o equilíbrio hidrofílico dos Scf D1UT (painel A) foi alcançado em 720 min. O equilíbrio hidrofílico do Scf B3UT (painel B) e D3UT (painel B) foi alcançado em 780 min. Para o Scf B1UT (painel A) o equilíbrio hidrofílico foi alcançado em 720 min. No tempo de saturação de cada Scf a capacidade de intumescimento obedeceu a seguinte ordem D1UT < B1UT < B3UT = D3UT, apresentando os percentuais de absorção de 231%, 326%, 233% e 218%, respectivamente. A capacidade de absorver maior quantidade de água do Scf B1UT e B3UT está relacionada com a maior concentração de QT no Scf. A mesma relação foi vista por Sionkowska, Kaczmarek e Lewandowska (2014) que produziram filmes de colágeno e quitosana, com diferentes proporções desses materiais.

O Scf B1UT apresentou uma maior capacidade de intumescimento do que o Scf B3UT, que possuem a mesma concentração de biomateriais, mas apresentam espessuras diferentes. Isso ocorreu porque o intumescimento gradual permite alterar o arranjo espacial do Scf aumentando o seu volume. A menor espessura pode ter se

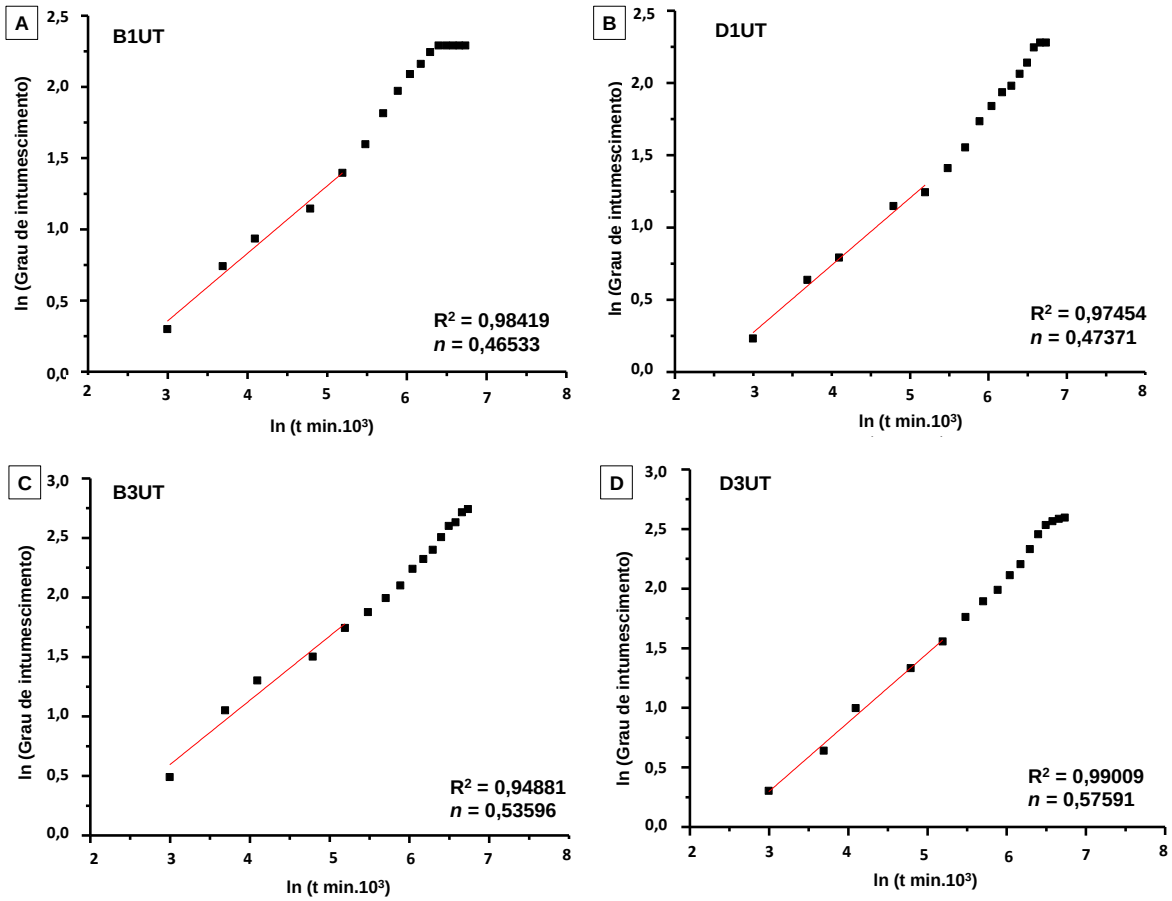
desestabilizado durante o intumescimento. No entanto, o processo de intumescimento é limitado pelas ligações inter e intramoleculares, pela rigidez intrínseca do polímero e pela espessura do filme polimérico (SRIAMORNSAK; KENNEDY, 2008).

Quando comparamos a capacidade de intumescimento entre os Scf que possuem a mesma espessura, B1UT-D1UT e B3UT-D3UT, os perfis de intumescimento foram semelhantes e estatisticamente iguais ($p>0,05$). No entanto ao compararmos os perfis de intumescimento dos Scfs compostos pela mesma formulação, porém com espessuras diferentes, B1UT-B3UT e D1UT-D3UT, os perfis de intumescimento foram estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

Alguns polímeros possuem grupamentos funcionais hidrofílicos em sua estrutura tais hidroxila, ácido carboxílico e aminas (SIEPMANN; PEPPAS, 2001), como é o caso da QT e ColTipoI que compõem os Scf. Esses biomateriais, quando em contato com o solvente, pode intumescer dentro de um período de tempo até atingir o equilíbrio hidrofílico. Cabe ressaltar que o intumescimento de um polímero é dependente do grau de interação entre as moléculas do polímero e do solvente. A dispersão de QT foi obtida em ácido acético 1,5% (m/v) para que os grupamento amino se tornassem protonados. A protonação em pH > 5,0 favorece o grau de intumescimento da QT (DASH et al., 2011). O maior grau de intumescimento dos Scf B1UT e B3UT se justifica pela maior proporção de QT (2ColTipoI:2QT) quando comparadas ao Scf D1UT e D3UT (4ColtipoI:1QT).

A Figura 28 (painel A-D) mostra a cinética de intumescimento, representada pela a curva de ln Q *vs* ln (t). Os Scfs D1UT, B1UT, B3UT e D3UT apresentam, respectivamente, os seguintes valores de n 0,46533, 0,47371, 0,53596 e 0,57591 e R^2 0,9849, 0,97454, 0,94881 e 0,99009.

Figura 28 – Cinética de intumescimento em PBS pH 7,4 dos Scf laminares B1UT (A), D1UT (B), B3UT (C) e D3UT (D)



Fonte: Elaboração própria

Os parâmetros da cinética de intumescimento contribuem para compreender como ocorre o processo de difusão do solvente para o interior do Scf (AOUADA et al., 2009). As curvas de ln Q *vs* ln t mostram um comportamento de intumescimento lento até atingir o ponto de equilíbrio hidrofílico. A lei de Fick é usada para explicar a cinética de intumescimento e comportamento de difusão do solvente em hidrogeis. Valores de *n* entre 0,45 e 0,50 correspondem à difusão de Fick. Valores de *n* fora desta faixa indicam que a difusão é do tipo não-Fickiano. Um valor de n=1,0 indica que a difusão do solvente para o interior da matriz tridimensional ocorre pela relaxação das cadeias que compõem a rede polimérica. Além disso, para 0,5 < n < 1,0 a difusão ocorre por transporte anômalo (SERRA; DOMÉNECH; PEPPAS, 2006; AOUADA et al., 2009).

Os valores de *n* para os Scfs laminares B1UT e D1UT mostraram que a difusão do solvente corresponde por difusão Fickiana. De acordo com a lei de Fick, haverá uma diferença na concentração desses íons de um lado para outro. A força

exercida pelo campo elétrico formado na membrana direcionará os íons na direção oposta ao meio de menor concentração e a difusão do solvente ocorrerá até que o equilíbrio do fluxo total dos íons através da membrana seja zero (KIPCAK et al., 2014). Os valores de *n* para os Scfs laminares mais espessos (B3UT e D3UT) mostraram que a difusão do solvente ocorreu por transporte anômalo. No caso de transporte anômalo, o processo de difusão é governado ao mesmo tempo pela difusão do solvente e pelo relaxamento das cadeias matriciais tridimensionais (DANYUO et al., 2019). No entanto, o relaxamento das cadeias matriciais tridimensionais depende da mobilidade intramolecular e intermolecular, bem como da rigidez e espessura do filme polimérico (SIONKOWSKA; KACZMAREK; LEWANDOWSKA, 2014).

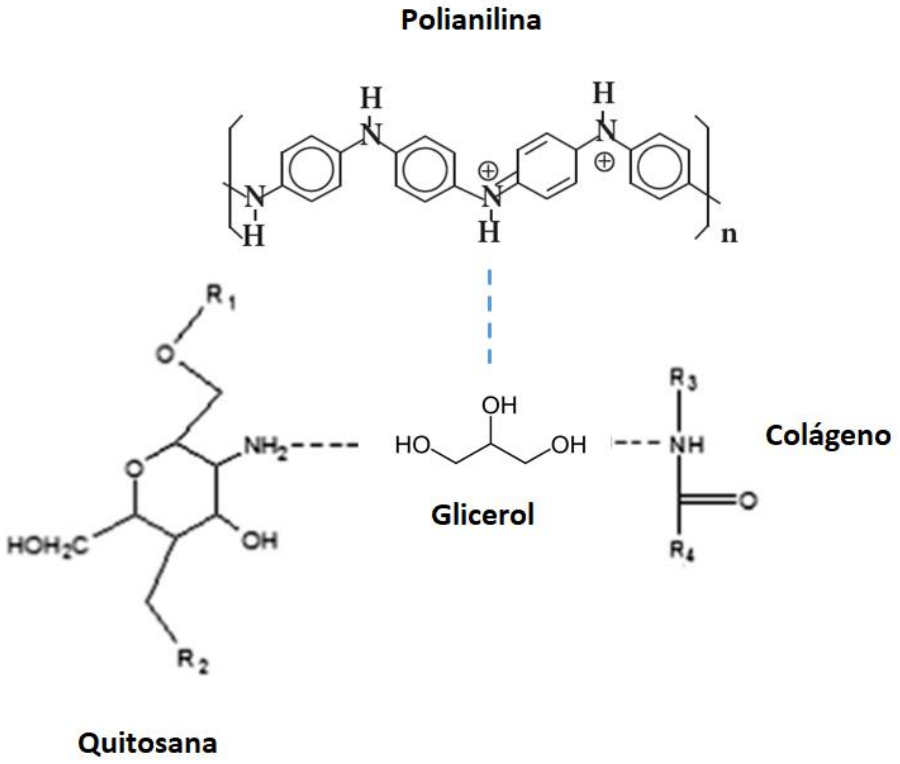
Assim, os resultados apresentados na Figura 27 e 28 (Paineis A-D) mostraram que a concentração de ColTypoI e QT influencia na capacidade de intumescimento dos Scfs e a espessura no comportamento de difusão.

5.4 *Scaffold* laminar com capacidade eletrocondutiva

A formulação DUT (4ColtipoI:1QT) selecionada para este estudo, foi baseada nos melhores resultados apresentados nas avaliações físico-quimicas, características estruturais, propriedades fisiomecânicas e capacidade de mucoadesão obtidas em estudo anterior. A incorporação da PANI em meio ácido irá contribuir para manter a forma de esmeraldina protononada (Figura 9) responsável pela condução elétrica (SIRIVISOOT et al., 2014). Cabe ressaltar que neste estudo a PANI foi dopada em meio ácido, esse processo favorece a protonação dos grupamentos amino (NH_3^+) presentes na estrutura, conferindo alta condutividade (MAWAD et al., 2016).

Neste estudo foi utilizado o glicerol como agente reticulante e plastificante do ColTipoI, QT e PANI. Essa escolha foi baseada no trabalho desenvolvido por Sionkowska, Kazmarec e Lewandowska que utilizaram ácido tânico, rico em grupamentos hidroxilas (OH), para realizar a ligação entre os grupamentos amino (NH_2) protononados (ColTipoI, QT) quando dispersos em meio ácido. (SIONKOWSKA; KACZMAREK; LEWANDOWSKA, 2014; VARGAS et al., 2017). A Figura 29 apresenta a possível interação molecular entre o ColTipoI, QT, PANI e glicerol.

Figura 29 - Ligações de hidrogênio para formação do cross linking entre a quitosana, colágeno tipo I, polianilina e glicerol.

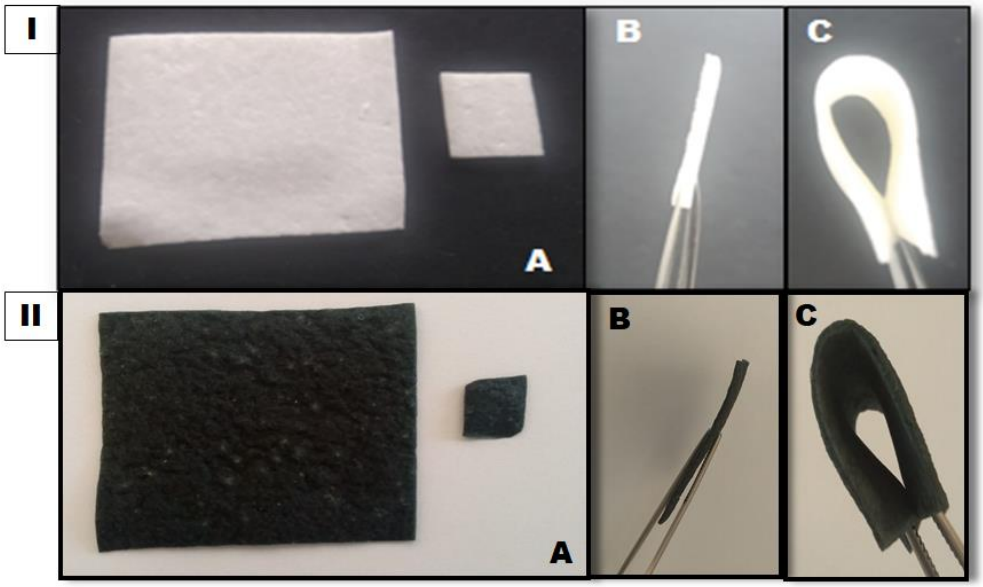


Fonte: Adaptado de Sionkowska, Kazmarec e Lewandowska (2014); Vargas et al. (2017).

5.4.1 Características macroscópicas

A Figura 30 (letra A) mostra a aparência macroscópica do Scf laminar de ColTypoI-QT-Glicerol sem PANI (Painel I) e com PANI (Painel II) obtidos pelo método de extensão (Figura 12) e liofilização.

Figura 30 - Imagens fotográficas do Scfs dos Laminares D3UT (I) e DP3UT (II) - (A) Imagem frontal, (B) imagem lateral e (C) Imagem do Scf flexionado.



Fonte: Elaboração própria

A análise macroscópica dos resultados mostra que a incorporação da PANI não interferiu na formação do Scf Laminar mantendo uma estrutura homogênea. Os extensores (Figura 11) favorecem a produção de Scf laminares com capacidade eletrocondutiva com comprimento e largura que podem ser adaptadas de acordo com o tamanho da lesão tecidual, com limite até 15 cm. Outra vantagem apresentada pelo método de extensão é a possibilidade de produzir Scf com espessuras previamente projetadas (Figura 12) de acordo com a altura da vazão do extensor utilizado.

A incorporação da PANI não interferiu na espessura dos Scf laminares (DP1UT) obtidos com extensor de 1 mm mantendo a média entre 0,9 mm ± 0,2 e pelo extensor de 3 mm (DP3UT) entre 1,2 mm ± 0,2, (n=6). Scf laminar contendo PANI (DP3UT) manteve a característica de ser flexionado quando comparado ao Scf laminar sem PANI (D3UT) (Figura 30 – letra C). Essa propriedade pode facilitar o recobrimento da lesão do miocárdio, se moldando na região arredondada do coração. Os agentes plastificantes, como o glicerol, possuem baixa massa molar e são muito utilizados para melhorar as propriedades mecânicas dos filmes poliméricos, favorecendo as propriedades de flexibilidade e alongamento. A baixa resistência à flexão é uma característica atraente para os Scfs utilizados para

regeneração de tecidos moles, pois apresentam a vantagem de evitar lesões nos tecidos saudáveis ao redor do tecido lesionado (AMOROSO et al., 2012).

Após a adição de 5% de glicerol as dispersões poliméricas contendo ColTipoI e QTP se misturaram de forma homogênea, o que indica que a concentração não ultrapassou a quantidade máxima para a formulação (DONHOWE; FENNEMA, 1993). A concentração máxima admissível de glicerol em dispersões poliméricas resulta em processo de exsudação e separação de fases, influenciando negativamente as propriedades do material.

5.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Esta técnica permitiu identificar alterações nas variáveis termodinâmicas ocorridas durante as transformações físico-químicas induzidas pelo aquecimento das matérias primas e Scf laminares. Tendo em vista que os Scf laminares obtidos com extensor de 1 mm e 3 mm possuíam a mesma formulação, para esta análise foram utilizados os Scf laminares estendidos com extensor de 3 mm. A Tabela 15 e Figura 31 mostram os resultados do DSC para as matérias primas (QT, ColTipoI e PANI) e Scf laminares (D3UT e DP3UT)

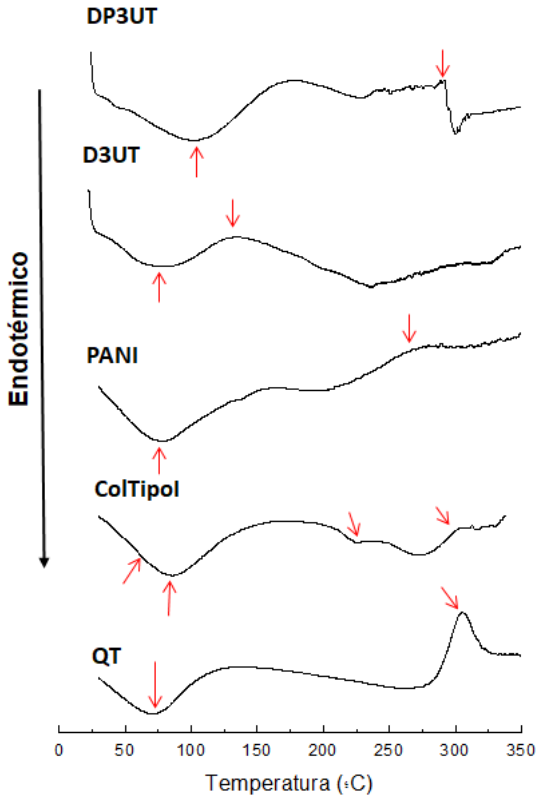
Tabela 15 - Temperatura referente à perda de água residual, variação de entalpia carbonização para matérias primas (QT, ColtipoI e PANI) e Scf laminares D3UT e DP3UT.

Material	Perda de água residual		Degradação
	Temp ºC	**Entalpia J/g (∆H)**	**Temp ºC**
ColTipoI	85	99	314
QT	71	63	305
PANI	98	110	322
D3UT	88	29	309
DP3UT	103	104	295

Fonte: Elaboração própria

Legenda: **QT** – Quitosana, **ColTipoI** – Colágeno tipo I e **PANI** - Polianilina.

Figura 31 - DSC das matérias primas QT; ColTipoI; PANI e Scf laminares D3UT e DP3UT



Fonte: Elaboração própria

Legenda: **QT** – Quitosana, **ColTipoI** – Colágeno tipo I e **PANI** - Polianilina.

A presença de água nas matérias-primas e Scf laminares avaliado em balança analítica acoplada a sistema de secagem por radiação infravermelha variou entre 3,94% (CH) a 12,11% (Scf DP3UT). Os termogramas de DSC apresentados na Tabela 15 e Figura 31 mostram que os primeiros eventos térmicos ocorreram nas temperaturas de 71ºC (QT) (paineis A-B) a 103ºC (DP3UT) corresponde a eliminação da água residual. A entalpia de mudança de estado líquido para vapor ocorre com o aumento da temperatura e pressão, o aumento da energia fornecida ao sistema resulta em um evento endotérmico. Os diferentes valores de entalpia das substâncias ocorrem devido em função da força de interações moleculares e das massas de seus componentes (GEROLA et al., 2010).

No termograma da QT (Figura 31 – painéis A e B) o evento exotérmico em 305ºC pode estar relacionado a degradação da amina GlcN (GUINESI; CAVALHEIRO, 2006). O ColTipoI (Figura 30) apresentou um evento térmico em com início 40ºC (*onset*) e término 120ºC (*endset*) referente a temperatura de

desnaturação, resultado semelhante ao encontrado por Tonhi e Pleplis (2002) que observaram que a desnaturação do ColTipoI ocorreu em 54º C. A desnaturação ocorreu devido ao aumento da temperatura que promove a quebra das ligações de hidrogênio e de algumas ligações cruzadas responsáveis por manter a estrutura proteica tridimensional (TONHI; PLEPLIS, 2002). O evento térmico em 220ºC apresentado pelo ColTipoI (Figura 31 – Painéis A e B) é referente a transição vítrea (*Tg*) dessa proteína, sendo que esse evento não foi observado nos Scf laminares.

Após a análise dos resultados podemos considerar que os materiais utilizados para a preparação dos Scf são miscíveis. A formação de ligações cruzadas no ColTipoI estabiliza a tripla hélice do colágeno e altera a *Tg* do material (CALDERON et al., 2010). Portanto, a incorporação do glicerol e QT pode ter favorecido a estabilidade da tripla hélice pela formação de ligações intermoleculares como demonstrado nos resultados do FTIR.

A incorporação da PANI (DP3UT) não interferiu na estabilidade da molécula. Esse resultado corrobora com a hipótese da interação molecular entre os grupamentos NH_2 do ColTipoI, QT e PANI com as hidroxilas (OH) do glicerol (Figura 31). A variação de entalpia (ΔH) é dada pela diferença entre a temperatura da amostra (T*onset*) e a temperatura da referência (T*endset*) (BERNAL et al., 2002). A análise dos resultados (Tabela 7) mostra que houve um aumento no valor de ΔH do Scf sem PANI (D3UT) para o Scf com PANI (DP3UT), respectivamente, 42 J/g e 104 J/g. Esse resultado sugere a PANI favoreceu o aumento do número de ligações intermoleculares com a molécula de água. Resultado semelhante foi obtido por Vargas et al. (2017) ao incorporar 25% de PANI em filmes contendo grafeno. A PANI é considerada um polímero que apresenta a capacidade de fazer ligações de hidrogênio com as moléculas de água, podendo realizar as ligações por uma ou duas pontes de hidrogênio. O tipo de ligação irá interferir na quantidade de energia de ativação necessária para romper a ligações intermoleculares realizadas o que pode aumentar o valor de entalpia do material (ΔH) (CANALES; ARADILLA; ALEMÁN, 2011).

Picos de degradação térmica (Tabela 7 e Figura 31) ocorreram em 314ºC (ColTipoI) , 305ºC (QT), 322ºC (PANI), 309ºC (D3UT) e 295ºC (DP3UT). As temperaturas de degradação do ColTipoI, QT e Scf ficaram próximas, para o ColTipoI essa temperatura está relacionada a perda das ligações de hidrogênio e

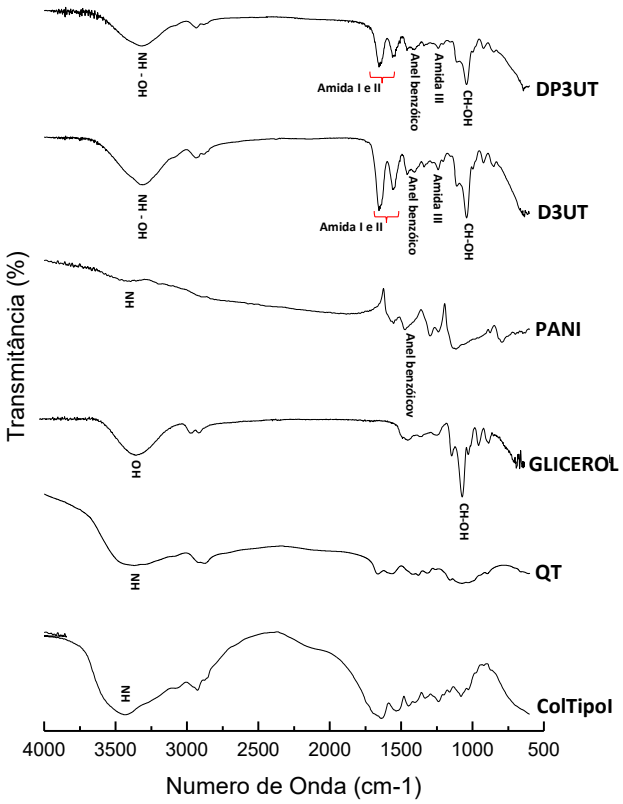
consequentemente, perda da estrutura terciária dessa proteína, no entanto esse fenômeno é reversível se a proteína for hidratada (LEÓN-MANCILLA et al., 2016).

Os resultados obtidos no ensaio de DSC mostraram um aumento a energia de entalpia (ΔH) com a incorporação da PANI, evidenciando o aumento das ligações intermoleculares referente ao crosslinking da PANI-glicerol.

5.4.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 32 mostra as interações intermoleculares entre as matérias primas e Scf laminares D3UT e DP3UT. Tendo em vista que os Scf laminares obtidos com extensor de 1 mm e 3 mm possuíam a mesma formulação, para esta análise foram utilizados os Scf laminares estendidos com extensor de 3 mm.

Figura 32 - Espectros FTIR das matérias primas ColTipoI; QT; Glicerol e PANI e Scf laminares D3UT e DP3UT



Fonte: Elaboração própria

Legenda: **QT** – Quitosana pura, **ColTipoI** – Colágeno tipo I puro, **PANI** - Polianilina

A análise dos resultados referente aos grupamentos químicos característicos do ColTipoI, QT e Glicerol estão descritos no item 5.3.3. A presença dos grupamentos característicos da PANI no Scf DP3UT (Figura 32) demonstra que esse

biomaterial foi incorporado com sucesso é que não afetou as interações eletrostáticas entre a QT e ColTipoI. Cabe ressaltar que ao incorporarmos a PANI na formulação, a mesma estimulará a propagação elétrica pela estrutura do Scf favorecendo a proliferação dos cardiomiócitos e recuperação funcional do tecido cardíaco (MAWAD et al., 2016). Além disso, o ColTipoI juntamente com o QT irão favorecer a adesão e retenção celular no tecido orgânico (HAO et al., 2008; HAO et al., 2008). Nenhuma banda adicional foi identificada o que sugere que não ocorreu a formação de um novo compósito.

A partir dos resultados analisados na espectroscopia FTIR (Figura 32, painéis A-B) associados aos termogramas (Figura 31, painéis A-B) que não ocorreu à formação de um novo compósito e que a incorporação da PANI favoreceu o aumento das ligações intermoleculares (crosslinking) da PANI com o glicerol. O mesmo evento foi evidenciado nos resultados obtidos pela análise térmica (DSC).

5.4.4 Capacidade de condutividade do impulso elétrico

A Tabela 16 mostra os resultados da avaliação da capacidade de condutividade do impulso elétrico dos Scf laminares D1UT, DP1UT, D3UT e DP3UT.

Tabela 16 - Avaliação da capacidade de condutividade do impulso elétrico dos Scf laminares D1UT, DP1UT, D3UT E DP3UT, *(n=3).*

Material	**D1UT**		**DP1UT**	
	1 cm^2	2 cm^2	1 cm^2	2 cm^2
Condutividade (S/cm)	$7{,}0.10^{-7} \pm 0{,}4.10^{-7}$	$7{,}67.10^{-7} \pm 0{,}2.10^{-7}$	$0{,}77.10^{-3} \pm 0{,}1.10^{-3}$	$1{,}17.10^{-3} \pm 0{,}3.10^{-3}$
Material	**D3UT**		**DP3UT**	
	1 cm^2	2 cm^2	1 cm^2	2 cm^2
Condutividade (S/cm)	$6{,}14.10^{-7} \pm 0{,}2.10^{-7}$	$7{,}76.10^{7} \pm 0{,}7.10^{-7}$	$0{,}84.10^{-3} \pm 0{,}1.10^{-3}$	$1{,}25.10^{-3} \pm 0{,}4.10^{-3}$

Fonte: Elaboração própria

Ao observarmos os resultados (Tabela 16) os Scf sem PANI (DP1UT) apresentaram uma condutividade do impulso elétrico de $0{,}77.10^{-3} \pm 0{,}1.10^{-3}$ e $1{,}17.10^{-3} \pm 0{,}1.10^{-3}$ S/cm e os Scf DP3UT apresentaram uma condutividade do impulso elétrico de $0{,}84.10^{-3} \pm 0{,}1.10^{-3}$ e $1{,}25.10^{-3} \pm 0{,}4.10^{-3}$ S/cm, respectivamente para 1 cm^2 e 2 cm^2 de dimensão. Resultados semelhantes de condutividade do impulso elétrico foi encontrado por Qazi et al. (2014) que obteve uma condutividade $1{,}29.10^{-3} \pm 1.10^{-3}$ S/cm em filmes de poly(glycerol-sebacate) contendo 15% PANI

(QAZI et al., 2014). Valor de condutividade do impulso elétrico diferente foi obtido por Martins et al. (2014), ao desenvolverem Scf de quitosana-carbono. Eles avaliaram a condutividade do material seco que ficou em 0,25 ± 0,09 S/m e quando hidratado a condutividade foi para 0,04 ± 0,02 S/m. Os pesquisadores ainda puderam observar que o Scf de quitosana-tubos de carbono aumentaram a atividade metabólica e expressão de genes cardíacos específicos associados à contração e à condução de sinais elétricos.

A análise dos resultados mostra que a capacidade de condutividade do impulso elétrico é influenciada pela dimensão do Scf, tendo em vista que as amostras com dimensão de 1 cm^2 apresentaram menor condutividade do impulso elétrico do que as amostras com 2 cm^2 de dimensão. Esse resultado é justificável, pois a PANI, polímero condutor, está distribuído homogeneamente na amostra. Desta forma, as amostras de maior dimensão (2 cm^2) apresenta uma quantidade de PANI maior. No entanto, o aumento da condutividade do impulso elétrico não é proporcional ao aumento da dimensão da amostra, pois a condutividade do impulso elétrico aumentou em 51% para o Scf DP1UT e 54% para o Scf DP3UT em relação ao aumento de 1 cm^2 para 2 cm^2 de amostra. Esses resultados mostram que existe um limite de condutividade do impulso elétrico para os materiais, porém na literatura consultada não foi avaliada a capacidade eletrocondutiva em amostras de diferentes dimensões o que dificulta a comparação dos resultados.

A incorporação da PANI nos Scf laminar (D1UT e D3UT) permitiu que ocorresse condutividade do impulso elétrico quando estas estavam em contato com água ultrapura, conforme apresentado na Tabela 16. Esse resultado era esperado, pois Scf formado por fibras poliméricas e polianilina permite a condução de estímulo elétrico pela extensão do dispositivo. Estudo realizado por Borriello et al. (2011) demonstrou que o estímulo elétrico gerado por dispositivos biológicos favoreceu a diferenciação das células mesenquimais e cardiomiócitos (BORRIELLO et al., 2011).

As células cardíacas são conectadas entre si pelas chamadas junções *gap* que formam um canal adjacente que permite o fluxo de corrente elétrica gerada pelos íons. Devido a essas conexões o sinal elétrico é propagado para todo o músculo cardíaco permitindo que ocorra a contração (sístole) e diástole cardíaca (KAISER; COULOMBE, 2015). Um dos problemas apresentados após o IAM é a interrupção do sinal elétrico no músculo cardíaco, o desenvolvimento de Scf com

potencial para conduzir os sinais elétricos têm sido produzidos com grafeno, óxido de grafeno, nanotubos de carbono e PANI (MAWAD et al., 2016).

Os resultados de condução elétrica apresentado pelos Scf laminares contendo PANI (Tabela 16) são promissores para favorecer a propagação da condutividade do impulso elétrico entre cardiomiócitos. Os Scf com capacidade eletrocondutiva apresenta maiores taxas de proliferação de cardiomiócitos e apresenta melhora da função cardíaca após o IAM (MAWAD et al., 2016). Os valores obtidos neste estudo próximos aos resultados apresentados por Roberts-Thomson et al (2009) a condutividade do miocárdio variou de $1{,}6.10^{-3}$ S/cm e $5{,}5.10^{-3}$ S/cm. Construções eletricamente ativas podem ter um efeito benéfico em tecidos eletrorresistentes, como o cérebro, coração e sistema nervoso. PCs como a polianilina, estão sendo considerados como componentes desses construtos por causa da sua natureza eletroativa. Outro experimento que corrobora para os Scf obtidos neste estudo foi realizado in *ex vivo* por Mawad et al. (2016) onde foi possível observar que a natureza condutiva do *patch* tem um efeito imediato sobre a eletrofisiologia do coração (MAWAD et al., 2016).

5.4.5 Propriedades fisiomecânicas e módulo de elasticidade

Na Tabela 17 são apresentados os valores nominais e o tratamento estatístico das propriedades fisiomecânicas de resistência ao alongamento, perfuração, flexibilidade e módulo de elasticidade para os Scf D1UT, DP1UT, D3UT e DP3UT.

Tabela 17 - Propriedades fisiomecânicas e elasticidade dos Scf laminares D1UT, DP1UT, D3UT e DP3UT. *(n=3).*

Scaffolds	**Alongamento ($N\ s^{-1}$)**	**Perfuração ($N\ s^{-1}$)**	**Flexibilidade ($N\ s^{-1}$)**	**Elasticidade (kPa)**
D1UT	$8{,}55 \pm 0{,}2^{a}$	$7{,}66 \pm 0{,}2^{a}$	$2{,}80 \pm 0{,}1^{a}$	$251{,}65 \pm 17{,}1^{a}$
DP1UT	$11{,}28 \pm 0{,}4^{b}$	$9{,}95 \pm 0{,}6^{b}$	$3{,}07 \pm 0{,}2^{a}$	$244{,}72 \pm 18{,}44^{a}$
D3UT	$10{,}79 \pm 0{,}3^{a}$	$16{,}37 \pm 0{,}3^{a}$	$2{,}96 \pm 0{,}2^{a}$	$278{,}86 \pm 15{,}3^{a}$
DP3UT	$21{,}68 \pm 0{,}5^{b}$	$18{,}19 \pm 0{,}7^{b}$	$3{,}40 \pm 0{,}3^{a}$	$253{,}94 \pm 5{,}9^{a}$

Fonte: Elaboração própria

As letras iguais (para mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre as médias dos valores (p>0,05) *(n=3).* Os demais resultados são estatisticamente diferentes

A análise dos resultados (Tabela 17) mostra que o Scf laminar contendo PANI (DP1UT) apresentou maior resistência ao alongamento (10,28 ± 0,6 $N.s^{-1}$) que o Scf laminar sem PANI (D1UT) que apresentou resistência ao alongamento de 8,55 ± 0,2 $N.s^{-1}$, sendo que os resultados são estatisticamente diferentes ($p < 0,5$). O mesmo resultado foi observado para os Scfs D3UT (10,79 ± 0,3 $N.s^{-1}$) e DP3UT (21,68 ± 0,6 $N.s^{-1}$) (Tabela 17). A resistência ao alongamento está relacionada à força necessária para alongar o Scf até o ponto de ruptura das ligações entre as cadeias poliméricas. Esta medida fornece a quantidade máxima de estresse (resistência ao esforço longitudinal) que o material pode suportar antes de romper (STOPPEL et al., 2015).. O aumento da resistência ao alongamento também foi observado por Azhar, Olad, Salehi (2014) quando a PANI foi adicionada no hidrogel de quitosana e nanoparticula de hidroxiapatatia, sendo que a resistência a elongação aumentou de 482 kPa para 1551 kPa (AZHAR; OLAD; SALEHI, 2014).

Na Tabela 17 é possível observar ainda que a força necessária para perfurar foi menor (7,66 ± 0,2 $N.s^{-1}$) para o Scf sem PANI (D1UT $N.s^{-1}$) e maior (9,95 ± 0,6 $N.s^{-1}$) para o Scf contendo PANI (DP1UT), sendo que os resultados são estatisticamente diferentes ($p < 0,5$). O mesmo resultado foi observado para os Scf D3UT (10,79 ± 0,3 $N.s^{-1}$) e DP3UT (21,68 ± 0,5 $N.s^{-1}$), sendo que os resultados são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Os ensaios de perfuração avaliam a capacidade de resistência do material quando submetido a uma determinada tensão até que ocorra a ruptura das cadeias poliméricas. Como explicado anteriormente esse aumento da resistência à perfuração é devido ao maior número de ligações eletrostática pela incorporação da PANI. A reticulação devido às ligações químicas ou físicas entre as cadeias poliméricas modifica as propriedades mecânicas, biológicas e de degradação de hidrogeis (MOSHIRI et al., 2017). Em estudo realizado por Azhar, Olad e Salehi (2014) a incorporação da PANI no hidrogel de quitosana e nanopartícula de hidroxipatita aumentou a resistência a compressão de 3.501 MPa para 5.061 MPa.

Para os ensaios de flexibilidade (Tabela 17) os Scf contendo PANI apresentaram um aumente na propriedade de flexibilidade das cadeias poliméricas. Porém esse aumento é apenas numérico, não tendo diferença estatística apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) entre esses Scfs. Os Scf sem PANI não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparados aos Scf da

mesma espessura contendo PANI. O ensaio de flexibilidade avalia a capacidade de um material sofrer uma deformação, quando submetido a uma tensão, sem que ocorra a ruptura das cadeias poliméricas.

A análise dos resultados descritos na Tabela 17 mostra que a resistência ao alongamento, perfuração e flexibilidade dos Scf laminares aumentaram em função da incorporação da PANI. Porém para o módulo de elasticidade isso não ocorreu. Isso sugere que a interação intermolecular dos grupamentos amina (NH_2) da PANI com os grupamentos hidroxila (OH) do glicerol (Figura 32) aumentou o número de ligações intermoleculares, conforme observado na banda referente a interação molecular NH-OH (3385 cm^{-1}) que corrobora com os resultados obtidos nos ensaios resistência ao alongamento, perfuração e flexibilidade. Esses resultados confirmam que o glicerol apresenta ação reticulante para o ColTipoI, QT e PANI como sugerido na Tabela 17.

O aumento das propriedades mecânicas (resistência ao alongamento, perfuração e flexibilidade) favorece o Scf para recuperação funcional e regeneração do tecido cardíaco isquêmico, pois a estrutura poderá acompanhar o movimento de contração do coração durante a sístole sem que ocorra ruptura da estrutura (ANNAS; ZERANIS; ARLEY, 2010). Outra hipótese para o aumento das propriedades mecânicas pode estar relacionado a diminuição do grau de porosidade apresentado pelos Scf sem PANI e com PANI (Tabela 19), que será discutido posteriormente. Tan, Li e Chen observaram que a diminuição da porosidade e aumento do tamanho dos poros resultou no aumento das propriedades mecânicas do Scf (TAN et al., 2011).

O desenvolvimento de Scf que proporcione porosidade combinada com elasticidade e resistência fisiomecânicas adequadas ainda são parâmetros desafiadores para a engenharia de tecido. Em particular as propriedades de deformação (elasticidade) do tecido cardíaco são propriedades fundamentais para beneficiar a regeneração do miocárdio infartado (NEAL et al., 2013). A Tabela 17 mostra os valores nominais e o tratamento estatístico dos resultados do módulo de elasticidade (módulo de Young). O módulo de Young ou o módulo de elasticidade é um indicador da rigidez do filme, e quanto maior o módulo, mais rígido é o material (STOPPEL et al., 2015).

A análise dos resultados (Tabela 17) mostra que o Scf contendo PANI (DP1UT) apresentou um módulo de elasticidade menor 244,12 ± 16,7 kPa o que o

Scf sem PANI (D1UT) que apresentou elasticidade de 251,65 ± 17,9 kPa, no entanto esses Scf não apresentam diferença estatística ($p > 0,05$). Para os Scf obtidos pelo extensor de 3 mm a propriedade elástica foi menor (253,94 ± 5,9 kPa) para o Scf contendo PANI (DP3UT) quando comparado com o Scf sem PANI (D3UT) que apresentou elasticidade de (278,76 ± 15,9 kPa), no entanto esses Scf não apresentam diferença estatística ($p > 0,05$). Desta forma, a incorporação da PANI não interferiu no módulo de elasticidade dos Scf laminares D1UT e D3UT. Resultado diferente foi obtido por Azhar, Olad e Salehi (2014) que obtiveram um aumento no módulo de elasticidade de 15,78 MPa para 25,45 MPa após a incorporação da PANI no hidrogel de quitosana e nanohidroxiapatita.

A capacidade elástica apresentadas pelos Scfs apresentam resultados adequados para serem utilizados na regeneração do tecido cardíaco e fora e a incorporação da PANI devido a ligação intermolecular (crosslinking) com o glicerol favoreceu a elasticidade do Scf. A estrutura altamente elásticas do miocárdio são responsáveis pela diástole e sístole cardíaca. Para tanto, a rigidez do ventrículo esquerdo (VE) varia de 10-20 kPa durante a diástole e 200-500 kPa durante a sístole. Além de influenciar as propriedades mecânicas, a rigidez do material poderá afetar a ligação do fenótipo celular na estrutura porosa (KAISER; COULOMBE, 2015).

Outro estudo que colabora com os resultados de módulo de elasticidade obtidos neste estudo é de Parl et al. (2010). Desenvolveram Scf elastoméricas compostos por poly(glycerol-sebate) com módulo de elasticidade entre 200 e 250 kPa. Após implantação *in vivo* apresentaram redução na apoptose celular e aumento na expressão da proteína troponina I (PARK et al., 2012). Além disso, as propriedades de rigidez (módulo de elasticidade) de Scf laminares na forma de patch podem contribuir para limitar a remodelação do ventrículo esquerdo (VE), prevenir a dilatação e reduzir a apoptose dos cardiomiócitos (TAKAHASHI; YAMAMOTO; TABATA, 2005; SERPOOSHAN et al., 2013).

Os resultados dos valores nominais e o tratamento estatístico da força máxima (Fmax) ($N.s^{-1}$) necessária separar os Scfs laminares D1UT, DP1UT, D3UT e DP3UT do discos de mucina em função do tempo são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - A capacidade de mucoadesão apresentadas pelos Scf laminares D1UT, DP1UT, D3UT e DP3UT. *(n=3)*

	Força máxima (Fmax) para separação (N) em função do tempo		
Scaffolds	**60s**	**120s**	**180s**
D1UT	2,44 ± 0,2[a]	2,85 ± 0,1[a]	2,65 ± 0,3[a]
DP1UT	2,48 ± 0,2[a]	2,86± 0,1[a]	2,69 ± 0,1[a]
D3UT	2,32 ± 0,1[a]	2,88 ± 0,1[a]	2,62 ± 0,3[a]
DP3UT	2,91 ± 0,3[b]	2,93 ± 0,1[a]	3,01 ± 0,1[b]

Fonte: Elaboração própria

As letras iguais (para mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre as médias dos valores (p>0,05) *(n=3).* Os demais resultados são estatisticamente diferentes

A análise dos resultados (Tabela 18) mostra que a Fmáx de adesão utilizada para o tempo de 60s de contato dos Scfs com o disco de mucina foi maior para os Scfs contendo PANI DP1UT e DP3UT, respectivamente, 2,48 ± 0,2 $N.s^{-1}$ e 2,91 ± 0,3 $N.s^{-1}$. No entanto a Fmáx de adesão do Scf DP3UT é estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do Scf D3UT.

No tempo de 120s a Fmax de adesão foi maior, numericamente maior, para os Scfs contendo PANI DP1UT (2,86 ± 0,1 $N.s^{-1}$) e DP3UT (2,93 ± 0,2 $N.s^{-1}$). No entanto a Fmax de adesão para os Scf com a mesma espessura não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

No tempo 180s, a Fmax de adesão foi, numericamente maior, para os Scfs contendo PANI DP1UT (2,97 ± 0,1 $N.s^{-1}$) e DP3UT (3,01 ± 0,1 $N.s^{-1}$). No entanto a Fmax de adesão para os Scf D1UT e DP1UT são estatisticamente diferentes ($p<0,5$).

A análise dos resultados mostra que a Fmáx de adesão dos Scf aumentou após a incorporação da PANI, para os Scf com espessura de 3 mm. A mucoadesão pode ocorrer por um ou mais mecanismos: por ligações de natureza eletrostática ou por ligações de hidrogênio, por intumescimento ou aumento da viscosidade ou por difusão onde ocorre a interpenetração das cadeias poliméricas (SUKNUNTHA et al., 2011). O aumento progressivo da Fmáx de adesão em função do aumento do tempo de contato de 60s para 180s. Esse resultado sugere o mecanismos de difusão é o responsável pela mucoadesão dos Scf ao disco de mucina. Quando o material é

colocado em contato com o muco ocorre á formação de ligações bioadesivas semipermanentes devido ao desenrolamento e consequente interpenetração das cadeias e entrelaçamento físico do polímero com as cadeias glicoproteicas do muco. A força de adesão aumenta com o grau de penetração das ligações bioadesivas, sendo que a força máxima de ligação será alcançada quando a profundidade de penetração for igual para o polímero e a glicoproteína do muco (SUKNUNTHA et al., 2011).

Vários fatores estão envolvidos na capacidade de mucoadesão dos polímeros tais como a massa molar, a densidade das cadeias poliméricas, mobilidade/flexibilidade das cadeias poliméricas, temperatura, gradiente de concentração estabelecido, os respectivos coeficientes de difusão e o grau de crosslinking, sendo que um elevado grau diminuirá a mobilidade do polímero, o que causará uma menor penetração interfacial (FIGUEIRAS; CARVALHO; VEGA, 2007). A incorporação da PANI aumentou o grau de reticulação das cadeias poliméricas dos Scf DP1UT e DP3UT, como observado nos resultados obtidos pelos ensaios de propriedades fisiomecânicas (Tabela 17) e pela diminuição da banda NH-OH evidenciada na análise de FTIR (Figura 32). A PANI no estado de sal de esmeraldina utilizada neste estudo apresenta grupamentos amina (NH) protonados o que pode ter contribuído para aumentar a mucoadesão nos discos de mucina. Esses resultados sugerem que podemos ter dois mecanismos de mucoadesão difusão e interpenetração das cadeias poliméricas.

5.4.6 Microtomografia computadorizada (µCt)

A Tabela 19 mostra a porosidade (%), volume de poros abertos (mm^3), poros fechados (%) e grau de anisotropia dos Scf laminares. O resultado da porosidade dos Scfs laminares obtidos no extensor 1 mm realizados no µCT (Tabela 12) foi de 58,36% (DP1UT) e 62,38% (D1UT), o percentual de poros fechados variou entre 0,15% (D1UT) e 0,17% (DP1UT) e o grau de anisotropia foi maior para D1UT (0,74755) e menor DP1UT (0,71519). Para os Scfs laminares obtidos no extensor 3 mm realizados no µCT (Tabela 12) a porosidade variou entre 67,81% (DP3UT) e 76,50% (D3UT), o percentual de poros fechados variou entre 0% (D3UT) e 0,15% (DP3UT), o grau de anisotropia foi maior para D3UT (0,98732) e menor para DP3UT (0,96910).

Tabela 19 - Descrição da porosidade (%), poros fechados (%), volume de poros abertos (mm-^{3}) e grau de anisotropia dos Scf laminares D1UT, DP1UT, D3UT e DP3UT

Propriedades	D1UT	DP1UT	D3UT	DP3UT
Porosidade (%)	62,38	58,36	76,50	67,81
Volume de poros abertos (mm^3)	6,02	3,95	2,82	6,6
Poros fechados (%)	0,15	0,17	0,00	0,15
Grau de anisotropia	0,74755	0,71519	0,98732	0,96910

Fonte: Elaboração própria

A análise dos resultados mostra que o percentual de porosidade diminui de 62,38% (D1UT) para 58,36% (DP1UT) e de 76,50% (D3UT) para 67,81% (DP3UT) com a incorporação da PANI. Azhar, Olad e Salehi (2014) observaram que a porosidade diminiu de 96% para 85% com a incorporação da PANI em Scf de PDLLA. Estes resultados sugerem que a concentração do biomaterial influencia o percentual de porosidade dos Scf. O aumento do tamanho dos poros e a concentração do PDLLA resultou na diminuição do grau de porosidade e aumento das propriedades mecânicas (TAN et al., 2011). O tamanho, distribuição dos poros e grau de porosidade presente na estrutura do Scf são fatores críticos que determinam a transferência de massa de oxigênio e nutrientes para favorecer o crescimento vascular no interior do Scf. A interconectividade dos poros para o Scf é um parâmetro de extrema importância por mimetiza à rede microvascular fisiologicamente organizada. A porosidade por sua vez proporciona uma grande área de superfície que permite a fixação das células, proliferação celular na superfície dos poros e promove o crescimento tecidual (RADISIC et al., 2006; KAISER; COULOMBE, 2015; KAISER; COULOMBE, 2015)

Todos os Scf apresentam grau de anisotropia, no entanto, os Scf com espessura menor (D1UT e DP1UT) apresentam característica isotrópica e anisotrópica. O congelamento mais rápido dos Scf de menor espessura influencia a o alinhamento do colágeno, interferindo na formação da estrutura anisotrópica.

A obtenção de estrutura anisotrópica dos Scf laminares foi obtida pelo processo de congelamento rápido -80ºC. Christine et al. (2016) desenvolveram Scf de característica anisotrópica compostos por gelatina e fibroína da seda congelando as dispersões poliméricas com nitrogênio. Outro fator que contribuiu para a

formação da estrutura anisotrópica é que durante a preparação do Scf a dispersão de ColTipoI QT e PANI permaneceram sob refrigeração durante 24 h . A baixa temperatura contribui para o processo de geleificação do colágeno, formando estruturas ordenadas e estabilizadas por ligações de Van der Waals e por ligações de hidrogênio. Durante a geleificação as proteínas livres e desordenadas são alteradas para uma conformação helicoidal formando uma rede estruturada (NEKLYUDOV, 2003). No entanto com a incorporação da PANI ocorreu uma redução no grau de anisotropia (Tabela 19), como os grupamentos amina (NH) da PANI realizada uma interação eletrostática com os grupamentos hidroxila (OH) do glicerol (Figura 32) pode ter ocorrido uma diminuição da interação dos grupamentos NH do ColTipoI com o grupamento OH do glicerol diminuindo a formação das fibrilas colagenosas. As alterações eletrostáticas podem aumentar ou diminuir o diâmetro da fibrila de colágeno, e consequentemente interferir na estrutura da proteína (ACHILLI; MANTOVANI, 2010).

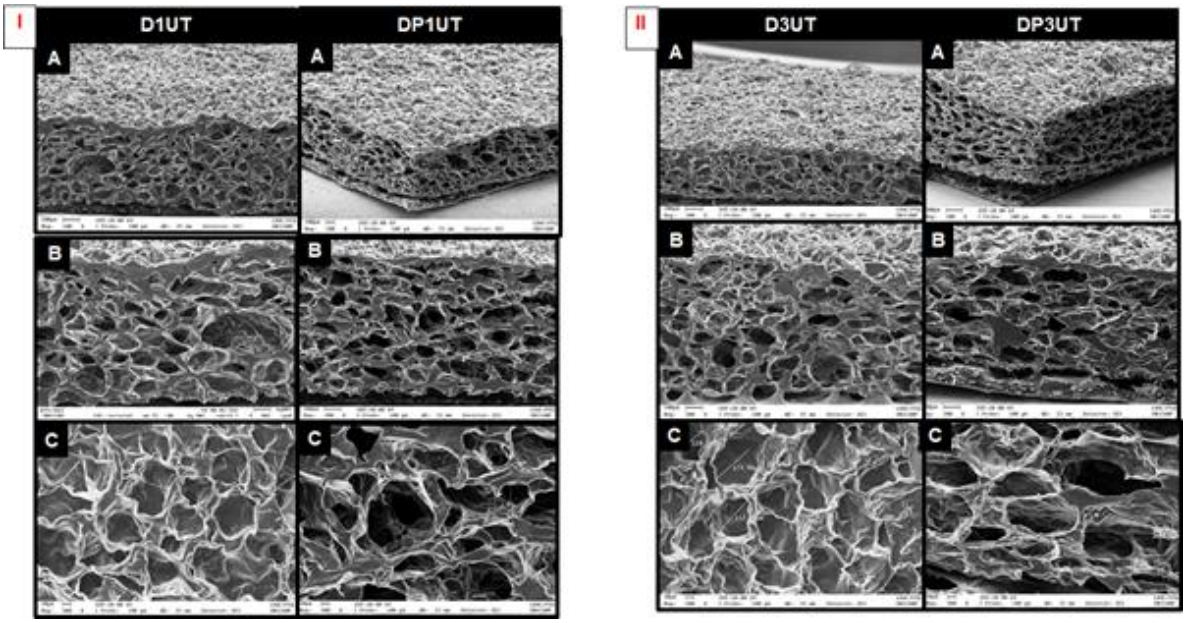
Os resultados obtidos mostram que os Scf laminares com e sem PANI apresentam propriedades estruturais de porosidade e anisotropia adequadas para serem aplicados na regeneração do tecido cardíaco, em especial o Scf laminar D1UT e D3UT (Tabela 19).

5.4.7 Microscopia de varredura eletrônica (MEV)

A Figura 33 (Paineis I – II) mostra as imagens realizadas por microscopia de varredura eletrônica (MEV) dos Scfs laminares D1UT e DP1UT (painel I), D3UT e DP3UT (painel II). Vista lateral – com magnitude de 100x (A), 200 x (B) e 500 x (C). É possível observar em todas as imagens que ocorreu formação de estrutura porosa tridimensional com poros distribuídos ao longo da estrutura do Scf. Esses resultados sugerem que a incorporação da PANI não interferiu na formação de uma estrutura porosa, apesar de ter diminuído o grau de porosidade (Tabela 19). No aumento de 500 x (Painéis I-II) as imagens C apresentam profundidade nos poros evidenciando a interconectividade entre os mesmos. A porosidade e interconectividade dos poros apresentadas na Figura 33 e Tabela 19 é uma indicação de que a formulação é adequada para obtenção de Scf e que o método utilizado foi capaz de formar estrutura porosa, além de apresentar característica anisotrópica, propriedade necessária para a acomodação adequada dos cardiomiócitos.

. .

Figura 33- Microscopia de varredura eletrônica (MEV) dos Scfs laminares D1UT, DP1UT (painel I), D3UT e DP3UT (painel II). Vista lateral – com magnitude de 100x (A), 200 x (B) e 500 x (C).



Fonte: Elaboração própria

A Tabela 20 mostra a variação no tamanho dos poros dos Scf D1UT, DP1UT, D3UT e DP3UT, sendo que o Scf DP3UT apresentou poros com tamanho menor (72,61 µm) e também maior tamanho de poros (133,27 m). No processo de liofilização o tamanho do poro é influenciado pela temperatura de congelamento das dispersões poliméricas. À medida que o gelo cresce, a fase sólida é empurrada para fora do sistema contínuo pelos cristais de gelo, ficando concentradas em áreas entre os cristais. Depois que o gelo é removido por sublimação, ocorre a formação de poros na região que anteriormente existiam os cristais de gelo (CHRISTINE et al., 2016).

O tamanho dos poros variou entre 72,61–113,19 µm para D1UT, 88,01–119,11 µm para DP1UT, 93,85–113, 76 µm para D3UT e 61,38–113,27 µm para DP3UT. O tamanho dos poros pode ser dividido em nano tamanho (nano-rugosidade, <100 nm), micro porosidade (micro-rugosidade, 100 nm-100 µm) e macro-rugosidade (100 µm) (Vagaska et al. 2010) . Diferentes tamanhos de poros podem influenciar diferentes processos celulares: as membranas nanoparticulares mostraram-se importantes para a formação de fibras colágenas e MEC, enquanto os macroporos desempenham um papel importante na semeadura, distribuição, migração e posterior neovascularização *in vivo* (BRUZAUSKAIT et al., 2016). Como o processo de formação dos poros é influenciado pela técnica de preparação do Scf,

neste estudo foi utilizado o processo de liofilização para obtenção da estrutura porosa 3D. Durante o congelamento de hidrogeis ocorre a formação aleatória de cristais de gelo o que justifica diferentes tamanhos de poros. No entanto, o congelamento rápido procura formar estruturas mais padronizadas e diminuir a polidispersidade do tamanho dos poros (CHRISTINE et al., 2016).

Tabela 20 - Variação do tamanho dos poros dos Scf D1UT, DP1UT, D3UT e DP3UT

D1UT (µm)	**DP1UT** (µm)	**D3UT** (µm)	**DP3UT** (µm)
72,61 – 113,19	88,01 – 119,11	93,85 – 113,76	61,38 – 133,27

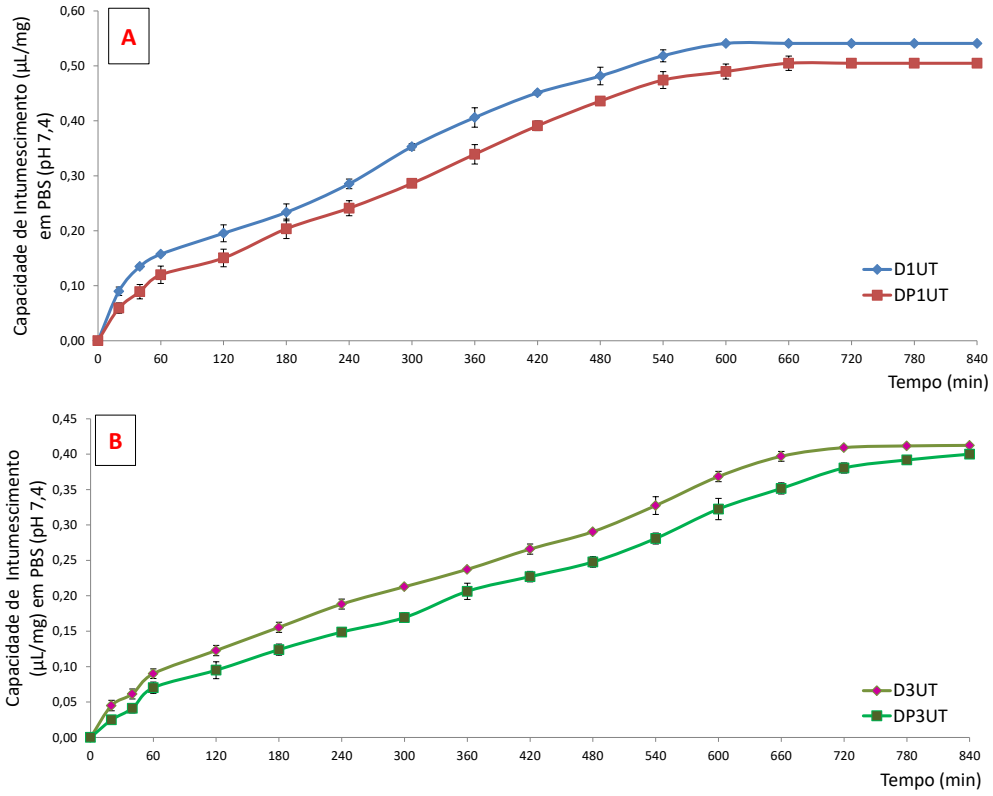
Fonte: Elaboração própria

O tamanho dos poros apresentados pelos Scf D1UT, DP1UT, D3UC e DP3UT são promissores para favorecer a angiogênese tecidual e regeneração do tecido cardíaco. Poros com tamanho de 40 µm resultaram em maior densidade de vasos ocasionando a fibrose do local. Em estudo in vivo, o tamanho de poros > 250 µm favoreceu a angiogênese, dando origem a um número maior de microvasos (DRUECKE et al., 2004)

5.4.8 Capacidade de Intumescimento

A Figura 34 mostra a relação do volume de meio absorvido (µL/mg) em função do tempo. O ensaio de intumescimento foi realizado em PBS pH 7,4 durante 840 min. Os resultados mostram que o equilíbrio hidrofílico dos Scf D1UT e DP1UT (painel A) foi alcançado em 720 min. O equilíbrio hidrofílico dos Scfs D3UT e DP3UT em 840 min (painel B) foi alcançado em 780 min. No tempo de saturação de cada Scf a capacidade de intumescimento dos Scf obedeceu a seguinte ordem D3UT = D1UT < D3UT < DP3UT, apresentando os percentuais de absorção 235%, 233%, 220º% e 204%, respectivamente.

Figura 34 - Capacidade de Intumescimento dos Scf laminares D1UT - DP1UT (A), D3UT – DP3UT (B) em PBS pH 7,4. *(n=3)*



Fonte: Elaboração Própria

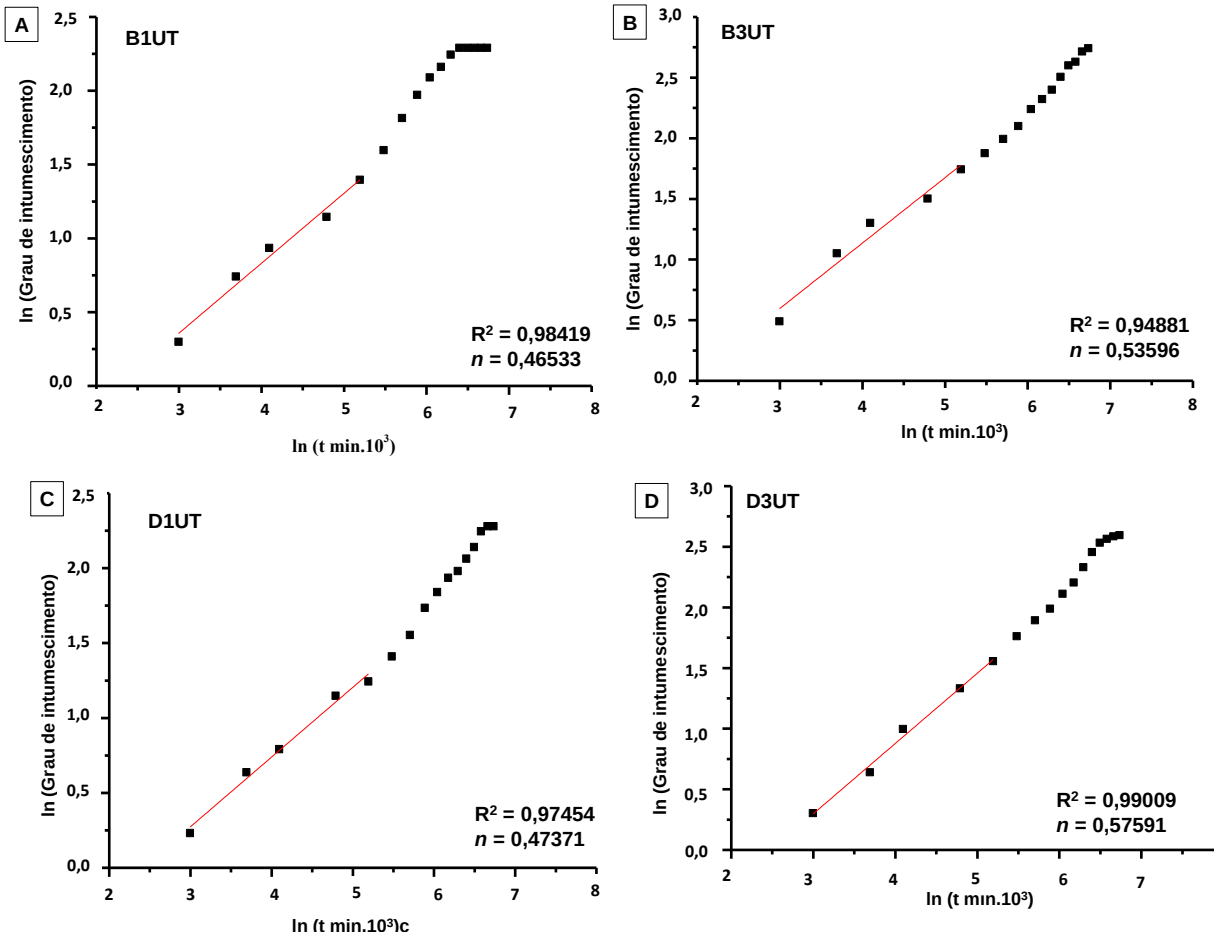
A análise dos resultados mostra que a incorporação da PANI não interferiu no equilíbrio hidrofílico dos Scfs utilizados como base para incorporação da PANI (D1UT e D3UT). No entanto, a capacidade de intumescimento foi maior para os Scf sem PANI (D1UT e D3UT) comparadas aos Scf com PANI (DP1UT e DP3UT), porém não apresentam diferença estatística ($p<0,5$). Os resultados obtidos neste estudo diferenciam dos obtidos por Azhar, Olad e Salehi (2014) que observaram que a incorporação da PANI em Scf de quitosana-gelatina e nanohidroxiapatita diminuiu a capacidade de intumescimento desses Scf. No entanto esses autores sugerem que a capacidade de absorção de água no Scf pode ser controlada utilizando outros materiais e com diferentes concentrações dos componentes na formulação.

Quando comparamos a capacidade de intumescimento entre os Scf que possuem a mesma espessura, D1UT-DP1UT e D3UT-DP3UT (Figura 34 – Paineis A e B), os perfis de intumescimento eram semelhantes e estatisticamente iguais ($p>0,05$). No entanto ao compararmos a capacidade de intumescimento dos Scfs compostos pela mesma formulação, porém com espessuras diferentes, D1UT-D3UT e DP1UT-DP3UT, a capacidade de intumescimento não foram semelhantes em

valores nominais e também são estatisticamente diferentes (p<0,05). Isso pode ter ocorrido porque o intumescimento gradual permite alterar o arranjo espacial do Scf aumentando o seu volume, a menor espessura pode ter se desestabilizado durante o intumescimento. No entanto, o processo de intumescimento é limitado pelas ligações inter e intramoleculares, pela rigidez intrínseca do polímero e pela espessura do filme polimérico (SRIAMORNSAK; KENNEDY, 2008).

A Figura 35 (painel A-D) mostra a curva de ln *Q* *vs* ln (*t*). Os Scfs D1UT, DP1UT, D3UT e DP3UT apresentam, respectivamente, os seguintes valores de *n* 0,46533, 0,45703, 0,57591 e 0,56005 e R^2 0,9849, 0,97919, 0,99009 e 0,97753.

Figura 35 – Cinética de Intumescimento em PBS pH 7,4 dos Scf laminares D1UT (A), DP1UT (B), D3UT (C) e DP3UT (D)



Fonte: Elaboração própria

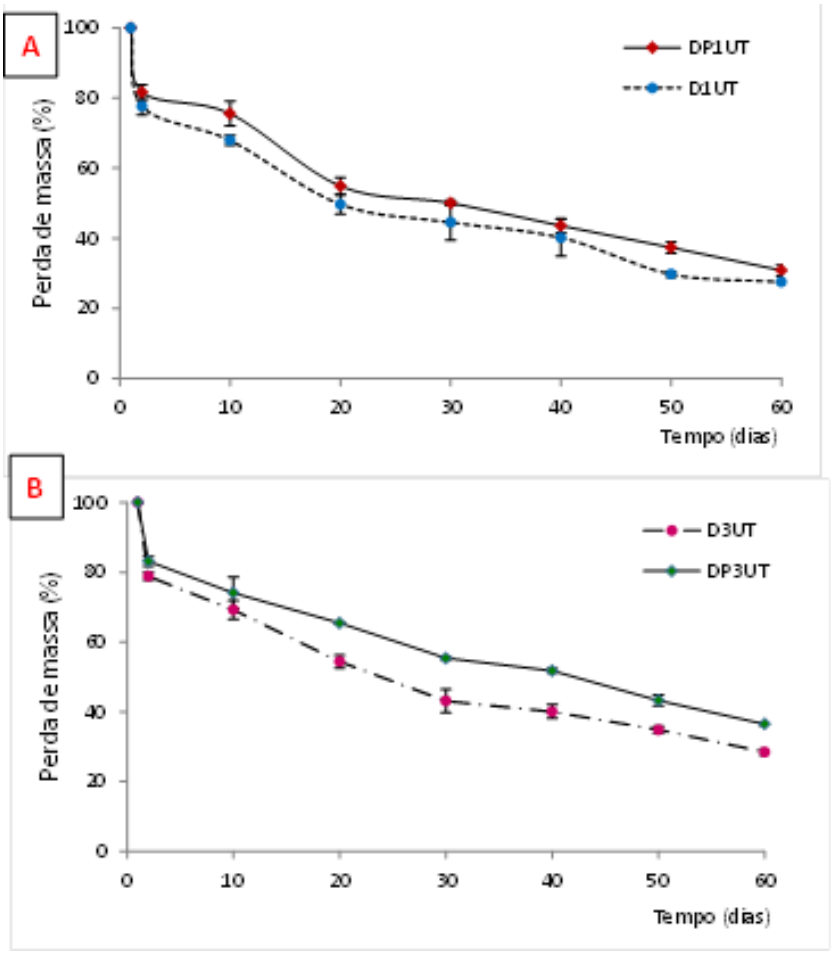
As curvas de ln Q vs ln t mostram um comportamento de intumescimento lento até atingir o ponto de equilíbrio hidrofílico. Os valores de *n* para os Scfs laminares D1UT e DP1UT mostram que a difusão do solvente corresponde por

difusão Fickiana. De acordo com a lei de Fick, haverá uma diferença na concentração desses íons de um lado para outro. A força exercida pelo campo elétrico formado na membrana direcionará os íons na direção oposta ao meio de menor concentração e a difusão do solvente ocorrerá até que o equilíbrio do fluxo total dos íons através da membrana seja zero (KIPCAK et al., 2014). Os valores de *n* para os Scfs laminares mais espesso (D3UT e DP3UT) mostraram que a difusão do solvente ocorreu por transporte anômalo. No caso de transporte anômalo, o processo de difusão é governado ao mesmo tempo pela difusão do solvente e pelo relaxamento das cadeias matriciais tridimensionais (DANYUO et al., 2019). No entanto, o relaxamento das cadeias matriciais tridimensionais depende da mobilidade intramolecular e intermolecular, bem como da rigidez e espessura do filme polimérico (SIONKOWSKA; KACZMAREK; LEWANDOWSKA, 2014). Os resultados apresentados na Figura 34 e 35 (Paineis A-D) mostram que a concentração de ColTypoI e QT influencia na capacidade de intumescimento dos Scfs e a espessura no comportamento de difusão.

5.4.9 Desintegração *in vitro* pelo método de imersão

A Figura 36 mostra o perfil de desintegração dos Scf D1UT-DP1UT (Painel A) e D3UT-DP3UT (Painel B).

Figura 36 - Perfil de desintegração dos Scf laminares D1UT, DP1UT (A), D3UT e DP3UT (B) em PBS pH 7,4



Fonte: Elaboração própria

A análise dos resultados mostra que o perfil de desintegração dos Scf apresentou comportamento linear no decorrer dos 60 dias de análise. A perda de massa foi maior para os Scf sem PANI D1UT (72,4%) e D3UT (71,6%) e menor para os Scf DP1UT (67,0%) e DP3UT (63,4%). No entanto, os Scf D1UT e DP1UT são estatisticamente iguais ($p<0,5$). Esses resultados demonstram que a incorporação da PANI nos Scf D1UT e D3UT diminuiu a taxa de degradação dos Scf. Os polímeros biodegradáveis contêm ligações hidrolisáveis, desta forma, o mecanismo de degradação (desintegração) química ocorre por hidrólise ou hidrólise catalisada por enzimas. Os polímeros hidrofílicos, como a QT e ColtTipoI, por absorverem grande quantidade de água favorecendo o aumento da taxa de degradação (GIJPFERICH, 1996). A maior taxa de degradação apresentada pelos Scf D1UT e D3UT está relacionada à capacidade hidrofílica dos biomateriais que compõem esses Scf e os resultados apresentados pela capacidade de intumescimento (Figura

33) corroboram com esse resultado. Outro fator que pode ter contribuído para diminuir a taxa de degradação dos Scf contendo PANI (DP1UT e DP3UT) é que a incorporação da PANI aumentou o grau de reticulação das cadeias poliméricas dos Scf DP1UT e DP3UT (Figura 17), como observado nos resultados obtidos pelos ensaios de propriedades fisiomecânicas (Tabela 71) e pela diminuição da banda NH-OH evidenciada na análise de FTIR (Figura 31). A taxa de desintegração de um Scf polimero é dependente do peso molecular, estrutura química, ligações hidrolíticas estáveis, ligações cruzadas, *Tg* e grau de cristalinidade (HANANI; SHAHITHA; HUSSAIN, 2014; HATAMZADEH et al., 2016).

Os Scf após os ensaios de desintegração apresentaram perda de massa, porém a estrutura física se manteve íntegra. Esses resultados sugerem que o mecanismo de desintegração do Scf ocorreu por erosão da estrutura. Polímeros que sofrem erosão mantêm o tamanho constante e geometria estrutural por um período considerável durante a sua aplicação (GIJPFERICH, 1996). Os estudos de desintegração *in vitro* é uma análise importante para avaliar o comportamento do Scf laminar *in vivo*, mimetizando as condições fisiológicas que a estrutura será submetida. Os resultados obtidos no ensaio de desintegração evidenciaram que integridade estrutural se manteve durante os 60 dias de análise, esses resultados irão beneficiar as propriedades mecânicas funcionais necessárias para a regeneração do tecido cardíaco. Estudos realizados por Cui, Baofeng e Ren Ke demonstraram que a implantação de hidrogel de alginato foi completamente absorvido após 6 semanas de aplicação, e, favoreceu reforço na lesão cicatricial, atenuando a dilatação cardíaca após 60 dias da ocorrência do IAM (CUI; YANG; LI, 2016).

A taxa de desintegração do Scf deve ser compatível com o tempo necessário para regeneração do novo tecido e restabelecimento das funções fisiológicas e anatômicas do tecido nativo. Quando o processo de desintegração ultrapassar o tempo de restauração tecidual, ocorrerá o aparecimento de uma resposta inflamatória indesejável, comprometendo a estrutura e as funções biológicas do tecido recém formado (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010; LU et al., 2011). É importante ressaltar que os produtos de degradação do Scf devem ser atóxicos, facilmente absorvidos ou excretados pelas vias metabólicas (TABATA, 2009).

6 CONCLUSÃO

As microesferas produzidas pela técnica de geleificação ionotrópica mostraram diâmetro adequado para serem injetados com agulha (0,23x4mm) na região anterior a lesão isquêmica. Os poros que serão formados pelo Scf microparticulado poderão disponibilizar uma área de superfície adequada para proliferação celular, penetração de nutrientes e eliminação de metabólitos.

A temperatura de congelamento a -80ºC das dispersões poliméricas favoreceu as propriedades mecânicas, formação da porosidade e tamanho dos poros compatíveis para proliferação dos cardiomiócitos.

A capacidade condutiva da PANI favorecerá a condução do impulso elétrico entre as microesferas e através do Scf laminar.

Os biomateriais selecionados para a produção da lamina Scf foram miscíveis de acordo com os resultados obtidos no ensaio FTIR, mostrando que uma nova formação de compósitos não ocorreu.

O uso de glicerol como agente de reticulação de ColTipoI-CH e PANI favoreceu as propriedades fisiomecânicas e foi eficiente em manter a estrutura integrada 60 dias após a imersão em PBS (pH 7,4). A técnica de obtenção de Scf por extensão permite a formação de laminar Scf, com espessura controlada pela taxa de fluxo dos polímeros.

Os laminares ColTipoI-CH-PANI apresentaram propriedades fisiológicas, porcentagem de porosidade, grau de anisotropia e capacidade de conduzir impulsos elétricos, sendo adequados para a regeneração de tecido cardíaco afetado por isquemia após IAM.

Os Scf obtidos mostraram resultados promissores para serem utilizados na regeneração e recuperação funcional do miocárdio após ser afetado por processo de isquemia prolongada.

REFERÊNCIAS

ABULATEEFEH, S. R.; TAHA, M. O. Enhanced drug encapsulation and extended release profiles of calcium-alginate nanoparticles by using tannic acid as a bridging cross-linking agent. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 1, p. 96–105, 2015.

ACHILLI, M.; MANTOVANI, D. Tailoring Mechanical Properties of Collagen-Based Scaffolds for Vascular Tissue Engineering: The Effects of pH, Temperature and Ionic Strength on Gelation. **Polymers**, v. 2, p. 664–680, 2010.

AGGARWAL, N. T.; MAKIELSKI, J. C. Redox Control of Cardiac Excitability. **Antioxidantes & Redos Signaling**, v. 18, n. 4, p. 432–468, 2013.

ALEGRIA, C. G. et al. Evaluation of Acellular Bilayer Silk Fibroin Grafts for Onlay Tracheoplasty in a Rat Defect Model. **Otolaryngology-Head and Neck Sugery**, p. 1–19, 2018.

AMOROSO, N. J. et al. Microstructural manipulation of electrospun scaffolds for specific bending stiffness for heart valve tissue engineering q. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 12, p. 4268–4277, 2012.

ANNAS, B. Y. I. V. Y.; ZERANIS, D. S. T.; ARLEY, B. A. H. Biologically active collagen-based scaffolds : advances in processing and characterization. **Philosophical Transactions of The Royal Society A**, v. 368, p. 2123–2139, 2010a.

ANNAS, B. Y. I. V. Y.; ZERANIS, D. S. T.; ARLEY, B. A. H. Biologically active collagen-based scaffolds : advances in processing and characterization. p. 2123–2139, 2010b.

AOUADA, F. A. et al. Correlação entre parâmetros da cinética de intumescimento com características estruturais e hidrofílicas de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose. **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1482–1490, 2009.

ASARIA, P. et al. Acute myocardial infarction hospital admissions and deaths in England: a national follow-back and follow-forward record-linkage study. **The Lancet Public Health**, v. 2, n. 4, p. e191–e201, 2017.

AVILÉS, M. O.; SHEA, L. D. Hydrogels to modulate lentivirus delivery in vivo from microporous tissue engineering scaffolds. p. 91–101, 2011.

AZHAR, F. F.; OLAD, A.; SALEHI, R. Fabrication and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite- polyaniline composite with potential application in tissue engineering scaffolds. **Designed Monomers and Polymers**, v. 17, n. 7, p. 654–667, 2014.

AZHARA, F. F.; OLADA, A.; SALEHIBC, R. Fabrication and characterization of chitosan–gelatin/ nanohydroxyapatite–polyaniline composite with potential

application in tissue engineering scaffolds. **Designed Monomers & Polymers**, v. 17, n. 7, p. 654–667, 2014.

BARDAKOVA, K. N. et al. From Aggregates to Porous Three-Dimensional Scaffolds through a Mechanochemical Approach to Design Photosensitive Chitosan Derivatives. **Marina Drugs**, v. 17, n. 48, p. 1–18, 2019.

BARRETO LUNA, C. B. et al. Development of Polymer Blends in order to Toughening of Polymers: A review. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 36, n. 1, p. 67, 2015.

BERGMANN, O. et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. **Science**, v. 324, n. 5923, p. 98–102, 2010.

BERNAL, C. et al. Influence of some experimental parameters on the results of diferencial scanning calorimetry 0 DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849–855, 2002.

BHAT, S.; KUMAR, A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. **Biomatter**, v. 3, n. 3, p. 37–41, 2013.

BIAN, W.; JACKMAN, C. P.; BURSAC, N. Controlling the structural and functional anisotropy of engineered cardiac tissues. **Biofabrication**, v. 6, n. 2, 2014.

BOEVA, Z. A.; SERGEYEV, V. G. Polyaniline : Synthesis , Properties , and Application. **Polymer Science**, v. 56, n. 1, p. 144–153, 2014.

BORRIELLO, A. et al. Optimizing PANi doped electroactive substrates as patches for the regeneration of cardiac muscle. **J. Mater. Sci: Mater Med**, v. 22, p. 1053–1062, 2011.

BOZEC, L.; ODLYHA, M. Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy. **Biophysical Journal**, v. 101, n. 1, p. 228–236, 2011.

BRUZAUSKAIT, I. et al. Scaffolds and cells for tissue regeneration : different scaffold pore sizes — different cell effects. **Cytotechnology**, v. 68, n. 55, p. 355–369, 2016.

CALDERON, L. et al. Type II Collagen-Hyaluronan Hydrogel - A Step Towards A Scaffold For Intervertebral Disc Tissue Engineering. **European Cells and Materials**, v. 20, p. 134–148, 2010.

CANALES, M.; ARADILLA, D.; ALEMÁN, C. Water absorption in polyaniline emeraldine base. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 49, n. 18, p. 1322–1331, 2011.

CHRISTINE, M. et al. Anisotropic silk fi broin / gelatin scaffolds from unidirectional freezing. **Materials Science & Engineering C**, v. 67, p. 646–656, 2016a.

CHRISTINE, M. et al. Anisotropic silk fi broin / gelatin scaffolds from unidirectional freezing. **Materials Science & Engineering C**, v. 67, p. 646–656, 2016b.

COHN, J. N. et al. Cardiac Remodeling — Concepts and Clinical Implications : A Consensus Paper From an International Forum on Cardiac Remodeling. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 35, n. 3, p. 569–582, 2000.

COULOMBE, K. L. K. et al. Heart Regeneration with Engineered Myocardial Tissue. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 16, n. 1, p. 1–28, 2014.

CUI, Z.; YANG, B.; LI, R. Application of Biomaterials in Cardiac Repair and Regeneration. **Engineering**, v. 2, n. 1, p. 141–148, 2016a.

CUI, Z.; YANG, B.; LI, R. K. Application of Biomaterials in Cardiac Repair and Regeneration. **Engineering**, v. 2, n. 1, p. 141–148, 2016b.

CUQ, B. et al. Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as affected by film thickness. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 3, p. 580–584, 1996.

DANYUO, Y. et al. Anomalous Release Kinetics of Prodigiosin from Poly-N-Isopropyl-Acrylamid based Hydrogels for The Treatment of Triple Negative Breast Cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.

DAS, M. K.; SENAPATI, P. C. **Furosemide-loaded Alginate Microspheres Prepared by Ionic Cross-linking Technique: Morphology and Release CharacteristicsIndian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2008. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2852066&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

DASH, M. et al. Chitosan — A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011.

DAVIDENKO, N. et al. Collagen-hyaluronic acid scaffolds for adipose tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 10, p. 3957–3968, 2010.

DAVIES, M. J. The pathophysiology of acute coronary syndromes. **HEART**, v. 83, p. 361–366, 2000.

DHANDAYUTHAPANI, B. et al. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application : A Review. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2011, p. 1–19, 2011.

DOMENECH, M. et al. Tissue Engineering Strategies for Myocardial Regeneration : Acellular Versus Cellular Scaffolds. **Tissue Eng Part B Rev.**, v. 22, n. 6, p. 439–456,

2016.

DONHOWE, I. G.; FENNEMA, O. The effects os platiizers on Crystallinity , Permeability and Mechanical Properties of Methylcellulose Films. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 17, p. 247–257, 1993.

DRUECKE, D. et al. Neovascularization of poly (ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo : Long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v. 68, p. 10–18, 2004.

FATHALA, A. Myocardial Perfusion Scintigraphy: Techniques, Interpretation, Indications and Reporting. v. 31, n. December, p. 625–634, 2011.

FIGUEIRAS, A.; CARVALHO, R.; VEGA, F. Mucoadhesive drug delivery systems in the oral cavity: Mucoadhesive mechanism and mucoadhesive polymers. **Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde**, v. 4, n. 4, p. 216–233, 2007.

FLORES-GARAY, K. A. et al. Síntesis de silicatos de calcio por el método Pechini e intercambio iónico de alginato de sodio-cloruro de calcio. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**, p. 1–7, 2016.

FRANCIS, G. S. Pathophysiology of Chronic Heart Failure. **Excerpta Medica**, v. 9343, n. 98, p. 37S–46S, 2001.

GELSE, K.; PO, E.; AIGNER, T. Collagens — structure , function , and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 1531–1546, 2003.

GEROLA, A. P. et al. Determinação da entalpia de vaporização de líquidos pelo método do isoteniscópio de Smith e Menzies. **Quimica Nova**, v. 33, n. 2, p. 482–488, 2010.

GIJPFERICH, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, p. 103–114, 1996.

GROVER, C. N. et al. Crosslinking and composition influence the surface properties , mechanical stiffness and cell reactivity of collagen-based films. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 8, p. 3080–3090, 2012.

GUIMARÃES, F. B. A. P. et al. Síntese sol-gel de scaffolds porosos de vidro bioativo com adição de agente porogênico (Sol-gel synthesis of bioactive glass porous scaffolds. **Cerâmica**, v. 62, p. 328–337, 2016.

GUINESI, L. S.; CAVALHEIRO, É. T. G. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. **Thermochimica Acta**, v. 444, n. 2, p. 128–133, 2006.

GUPTA, V. et al. Microsphere-Based Scaffolds in Regenerative Engineering. **Annu. Rev. Biomed. Eng**, v. 19, p. 135–161, 2017.

HAMMAN, J. H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1305–1322, 2010.

HANANI, F.; SHAHITHA, F.; HUSSAIN, J. In vitro degradation study of novel HEC / PVA / collagen nano fi brous scaffold for skin tissue engineering applications. **Polymer Degradation and Stability**, v. 110, p. 473–481, 2014.

HANG, S. O. N. G. Z. et al. The Correlation of 3D DT-MRI Fiber Disruption with Structural and Mechanical Degeneration in Porcine Myocardium. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 38, n. 10, p. 3084–3095, 2010.

HAO, W. et al. Collagen I Gel Can Facilitate Homogenous Bone Formation of Adipose-Derived Stem Cells in PLGA- ᴺᴸ -TCP Scaffold. **Cells Tissue Organs**, v. 187, p. 89–102, 2008.

HARDING, E. et al. Biomaterials in cardiac tissue engineering : Ten years of research survey. **Materials Science & Engineering R**, v. 59, p. 1–37, 2008.

HATAMZADEH, M. et al. Electrically conductive nanofibrous scaffolds based on poly(ethylene glycol)s- modified polyaniline and poly(ε-caprolactone) for tissue engineering applications. **Royal Society of Chemistry**, p. 1–52, 2016.

HUANG, S. et al. Engineered circulatory scaffolds for building cardiac tissue. **Journal of Thoracic Disease**, v. 10, n. I, p. S2312–S2328, 2018.

IAIZZO, P. A. **Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices**. Totowa: HUMANA PRESS INC., 2005.

ISWARIYA, S.; BHANUKEERTHI, AV POORNIMAVELSWAMYA, U. T.; PARAMASIVAN, T. Design and development of a piscine collagen blended pullulan hydrogel for skin tissue engineering. **RSC Adv.**, v. 1–3, p. 1–12, 2016.

IVER, R. K. et al. Engineered cardiac tissues. **Curr Opin Biotechnol**, v. 22, n. 5, p. 706–714, 2012.

KAISER, N. J.; COULOMBE, K. L. K. Physiologically inspired cardiac scaffolds for tailored in vivo function and heart regeneration. **Biomedical Materials**, v. 10, p. 1–15, 2015a.

KAISER, N. J.; COULOMBE, K. L. K. Physiologically inspired cardiac scaffolds for tailored in vivo function and heart regeneration. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 10, n. 3, p. 34003, 2015b.

KHORSHIDI, S. et al. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 2016.

KIPCAK, A. S. et al. Modeling and Investigation of the Swelling Kinetics of Acrylamide-Sodium Acrylate HydrogelKIPCAK, A. S. et al. Modeling and Investigation of the Swelling Kinetics of Acrylamide-Sodium Acrylate Hydrogel. Hindawi Publishing Corporation, v. 2014, p. 1–8, 201. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

KLEIN, T. J. et al. Tissue Engineering of Articular Cartilage with Biomimetic Zones. **Tissue Eng Part B Rev.**, v. 15, n. 2, p. 142–182, 2009.

KORECKY, B.; HAI, C. M.; RAKUSAN, K. M. A. K. Functional capillary density in normal. **Cam J Physiology Pharmacology**, v. 60, p. 23–32, 1982.

LAM, M. T.; WU, J. C. Biomaterial applications in cardiovascular tissue repair and regeneration. **Cell and gene therapies**, p. 1039–1049, 2012a.

LAM, M. T.; WU, J. C. Biomaterial applications in cardiovascular tissue repair and regeneration. p. 1039–1049, 2012b.

LANE, C. Cell-Based VEGF Delivery Prevents Donor Cell To the Editor : p. 1233–1234, 2007.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **Internacional journal of pharmaceutics**, v. 221, p. 1–22, 2001.

LEÓN-MANCILLA, B. H. et al. Physico-chemical characterization of collagen scaffolds for tissue engineering. **Journal of Applied Research and Technology**, v. 14, n. 1, p. 77–85, 2016.

LEOR, J.; AMSALEM, Y.; COHEN, S. Cells , scaffolds , and molecules for myocardial tissue engineering. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 105, p. 151–163, 2005.

LI, Y. et al. pH effects on collagen fibrillogenesis in vitro: Electrostatic interactions and phosphate binding. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 5, p. 1643–1649, 2009.

LI, Z. et al. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, p. 3919–3928, 2005.

LÓPEZ-DIAS, A. S. et al. Effect os ShortWare ultraviolet radioation on selected properties of edible films formulated wiht pomegranate juice and chitosan. **Revista Mexicana de Ingenieria Química**, v. 17, n. 1, p. 63–73, 2018.

LU, Q. et al. Degradation Mechanism and Control of Silk Fibroin. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 4, p. 1080–1086, 2011.

MAESTRELLI, F. et al. Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl- ᴺʟ -cyclodextrin complex. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 4, p. 1–11, 2008.

MAN, Y. et al. Angiogenic and osteogenic potential of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cell laden alginate microspheres. **Biomaterials**, v. 33, n. 34, p. 8802–8811, 2012.

MANDAL, B. B. et al. Laminar Silk Scaffolds for Aligned Tissue Fabrication. **Macromolecular Bioscience**, v. 13, p. 48–58, 2013.

MANOEL, D. et al. Propriedades de Barreira e Solubilidade de Filmes de Amido de Ervilha Associado com Goma Xantana e Glicerol. **Polímeros**, v. xx, p. 108, 2011.

MARTINS, A. M. et al. Electrically Conductive Chitosan/Carbon Sca ff olds for Cardiac Tissue Engineering. **Biomacromolecues**, v. 15, p. 635–643, 2014.

MAWAD, D. et al. A Conducting polymer with enhanced electronic stability applied in cardiac models. **Science Advances**, v. 2, n. 11, 2016a.

MAWAD, D. et al. A conducting polymer with enhanced electronic stability applied in cardiac models. **Science Advances**, v. 2, n. 11, p. e1601007, 2016b.

MEKALA, N. K. et al. Physical and degradation properties of PLGA scaffolds fabricated by salt fusion technique. **Journal of biomedical research**, v. 27, n. 4, p. 318–25, 2013.

MING, J.; ZUO, B. A novel electrospun silk fibroin/hydroxyapatite hybrid nanofibers. **Materials Chemistry and Physics**, v. 137, p. 421–427, 2012.

MING, T.; CHANG, S. Pharmaceutical and therapeutic applications of artificial cells including microencapsulation. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 45, p. 3–8, 1998.

MOSHIRI, A. et al. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 678–688, 2017.

MULDER, E. L. W. DE; BUMA, P.; HANNINK, G. Anisotropic Porous Biodegradable Scaffolds for Musculoskeletal Tissue Engineering. **Materials**, v. 2, p. 1674–1696, 2009.

MUNARIN, F.; COULOMBE, K. L. A Novel 3-Dimensional Approach for Cardiac

Regeneration. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc**, v. 2015, p. 1741–1744., 2015.

NADAL-GINARD, B.; ANVERSA, P.; LERI, A. A matter of life and death : cardiac myocyte apoptosis and regeneration Find the latest version : apoptosis and regeneration. **The Journal of Clinical Investigarion**, v. 111, n. 10, p. 1457–1459, 2003.

NASCIMENTO, T. A.; CALADO, V.; CARVALHO, C. W. P. Development and characterization of fl exible fi lm based on starch and passion fruit mesocarp fl our with nanoparticles. **Food Research Internacional**, v. 49, n. 1, p. 588–595, 2012.

NEAL, R. A. et al. Three-Dimensional Elastomeric Scaffolds Designed with Cardiac-Mimetic Structural and Mechanical Features. **Tissue Engineering Part A**, v. 19, p. 794–806, 2013.

NEKLYUDOV, A. D. Nutritive fibers of animal origin: collagen and its fractions as essential components of new and useful food products. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 229–238, 2003.

PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. **Materials**, v. 3, p. 1863–1887, 2010.

PARK, H. et al. The signi fi cance of pore microarchitecture in a multi-layered elastomeric scaffold for contractile cardiac muscle constructs. **Biomaterials**, v. 32, n. 7, p. 1856–1864, 2011.

PARK, H. et al. The significance of pore microarchitecture in a multi-layered elastomeric scaffold for contractile cardiac muscle constructs. **Biomaterials**, v. 32, n. 7, p. 1856–1864, 2012.

PERIOLI, L. et al. Chitosan and a modified chitosan as agents to improve performances of mucoadhesive vaginal gels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 1, p. 141–145, out. 2008.

PIEGAS, L. S. V DIRETRIZ DA SOCIEDADE SOBRE TRATAMENTO DO INFARTO. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 105, 2015a.

PIEGAS, L. S. V DIRETRIZ DA SOCIEDADE SOBRE TRATAMENTO DO INFARTO. v. 105, 2015b.

QUTACHI, O. et al. Injectable and porous PLGA microspheres that form highly porous scaffolds at body temperature. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 12, p. 5090–5098, 2014.

RADISIC, M. et al. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. **PNAS**, v. 101, n. 52, p. 18129–18134, 2004.

RADISIC, M. et al. Biomimetic Approach to Cardiac Tissue Engineering: Oxygen Carriers and Channeled Scaffolds. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 8, p. 2077–2091, 2006.

RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. B IOMATERIALS : Where We Have Been and Where We Are Going. **Annu. Rev. Biomed. Eng**, v. 6, n. 1, p. 41–75, 2004.

RAVICHANDRAN, R. et al. Applications of conducting polymers and their issues in biomedical engineering. **J. R. Soc. Interface**, v. 7, n. July, p. S559–S579, 2010.

REBELO, M. A. et al. Scaffolds and tissue regeneration: An overview of the functional properties of selected organic tissues. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, p. 1–12, 2015.

REIJENGA, J. et al. Development of Methods for the Determination of pK a Values. **Analytical Cheimistry Insights**, v. 8, p. 53–71, 2013.

RIBEIRO, C. C.; BARRIAS, C. C.; BARBOSA, M. A. Preparation and characterisation of calcium-phosphate porous microspheres with a uniform size for biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, p. 455–463, 2006.

SAHA, A. K.; RAY, S. D. Effect of cross-linked biodegradable polymers on sustained release of sodium diclofenac-loaded microspheres. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, 2013.

SALGADO, J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. Bone Tissue Engineering : State of the Art and Future Trends. **Macromolecul**, v. 4, p. 743–765, 2004.

SERPOOSHAN, V. et al. Biomaterials The effect of bioengineered acellular collagen patch on cardiac remodeling and ventricular function post myocardial infarction. **Biomaterials**, 2013.

SERPOOSHAN, V. et al. Use of bio-mimetic three-dimensional technology in therapeutics for heart disease. **Bioengineered**, v. 5, n. 2, p. 37–41, 2014.

SERRA, L.; DOMÉNECH, J.; PEPPAS, N. A. Drug transport mechanisms and release kinetics from molecularly designed poly(acrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels. **Biomaterials**, v. 27, n. 31, p. 5440–5451, 2006.

SHALUMON, K. T. et al. Microsphere-Based Hierarchically Juxtapositioned Biphasic Scaffolds Prepared from Poly (Lactic- co -Glycolic Acid) and Nanohydroxyapatite for Osteochondral. **Polymers**, v. 8, n. 429, p. 1–30, 2016.

SHIELS, H. A. **Cardiomyocytes Morphology and Physiology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017a. v. 36

SHIELS, H. A. **Cardiomyocytes Morphology and Physiology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017b. v. 36

SICARI, B. M. et al. An Acellular Biologic Scaffold Promotes Skeletal Muscle Formation in Mice and Humans with Volumetric Muscle Loss. **Biomaterials**, v. 6, n. 234, p. 1–10, 2014.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). v. 48, p. 139–157, 2001.

SILVA, A. M. H. DA et al. Two and three-dimensional morphometric analysis of trabecular bone using X-ray microtomography (µ CT). **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 30, p. 93–101, 2014.

SILVERTEINS, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILI, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânico**. 5. ed. Rio de Janieor: Guanabara Koogan, 2004.

SIONKOWSKA, A.; KACZMAREK, B.; LEWANDOWSKA, K. Modification of collagen and chitosan mixtures by the addition of tannic acid. **Journal of Molecular Liquids**, v. 199, p. 318–323, 2014.

SIRIVISOOT, S. et al. Protocol and cell responses in three-dimensional conductive collagen gel scaffolds with conductive polymer nanofibres for tissue regeneration Protocol and cell responses in three- dimensional conductive collagen gel scaffolds with conductive polymer nanof. **Interface focus**, v. 4, p. 1–12, 2014.

SOONPAA, M. H.; FIELD, L. J. Survey of Studies Examining Mammalian Cardiomyocyte DNA Synthesis. **Circulation Research**, v. 83, n. 1, p. 15–26, 1998.

SPAANS, C. et al. A new biomedical polyurethane with a high modulus based on 1,4-butanediisocyanate and epsilon-caprolactone. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 9, n. 12, p. 675–678, 1998.

SRIAMORNSAK, P.; KENNEDY, R. A. Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358, n. 1–2, p. 205–213, 2008.

STOPPEL, W. L. et al. Anisotropic silk biomaterials containing cardiac extracellular matrix for cardiac tissue engineering. **Biomedical Materials**, v. 034105, p. 34105, 2015.

SUÀREZ-GONZÀLEZ, D. et al. Controlled nucleation of hydroxyapatite on alginate scaffolds for stem cell-based bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 95A, n. 1, p. 222–234, 2010.

SUGAWARA, S.; IMAI, T.; OTAGIRI, M. **The Controlled Release of Prednisolone**

Using Alginate GelPharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists, 1994.

SUKNUNTHA, K. et al. Characterization of muco- and bioadhesive properties of chitosan , PVP , and chitosan / PVP blends and release of amoxicillin from alginate beads coated with chitosan / PVP. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 4, p. 408–418, 2011.

SUN, J.; TAN, H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. **Materials**, v. 6, n. 4, p. 1285–1309, 2013.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **J. R. Soc. Interface**, v. 6, n. March, p. S311–S324, 2009.

TAKAHASHI, Y.; YAMAMOTO, M.; TABATA, Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and b - tricalcium phosphate. **Biomaterials**, v. 26, p. 3587–3596, 2005.

TAN, Q. et al. Fabrication of Porous Scaffolds with a Controllable Microstructure and Mechanical Properties by Porogen Fusion Technique. p. 890–904, 2011.

TANG, Q.; WU, J.; LIN, J. A multifunctional hydrogel with high conductivity, pH-responsive, thermo-responsive and release properties from polyacrylate/polyaniline hybrid. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 2, p. 315–321, 2008.

TATTINI, JR, V. et al. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêtuicas**, v. 42, n. 1, p. 128–136, 2006.

TILKORN, D. J. et al. Implanted Myoblast Survival Is Dependent on the Degree of Vascularization in a Novel Tissue Engineering Model. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 1, p. 165–181, 2010.

TING, H. H.; YANG, E. H.; RIHAL, C. S. Narrative review_Reperfusion strategies for ST-segment elevation myocardial infarction. **Ann Intern Med**, v. 145, p. 610–617, 2016.

TONHI, E.; PLEPLIS, A. M. DE G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Quimica Nova**, v. 25, n. 6, p. 943–948, 2002.

TSAI, A. M.; NEUMANN, D. A.; BELL, L. N. Molecular dynamics of solid-state lysozyme as affected by glycerol and water: A neutron scattering study. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 5, p. 2728–2732, 2000.

UENO, H. et al. Evaluation e ! ects of chitosan for the extracellular matrix production by " broblasts and the growth factors production by macrophages. v. 22, p. 2125–2130, 2001.

UNGUREANU, C. et al. Improving natural biopolymeric membranes based on chitosan and collagen for biomedical applications introducing silver. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 3, p. 458–465, 2015.

VARGAS, L. R. et al. Formation of Composite Polyaniline and Graphene Oxide by Physical Mixture Method. **J. Aerosp. Technol. Manag**, v. 9, p. 29–38, 2017.

VAUGHAN, D. E.; PFEFFER, M. A. Myocardial Infarction Ventricular Remodeling : Animal and Human Studies. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 8, n. November 1993, p. 453–460, 1994.

VENKATESAN, J.; BHATNAGAR, I.; KIM, S. K. Chitosan-alginate biocomposite containing fucoidan for bone tissue engineering. **Marine Drugs**, v. 12, n. 1, p. 300–316, 2014.

VIKHOREV, P. G. Cardiomyopathies and Related Changes in Contractility of Human Heart Muscle. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. Dcm, p. 1–19, 2018.

WALLES, T. et al. Influence of scaffold thickness and scaffold composition on bioartificial graft survival. **Biomaterials**, v. 24, n. 7, p. 1233–1239, 2003.

WANG, C. C. et al. A highly organized three-dimensional alginate scaffold for cartilage tissue engineering prepared by microfluidic technology. **Biomaterials**, v. 32, n. 29, p. 7118–7126, 2011.

WANG, H. et al. The Use of Micro- and Nanospheres as Functional Components for Bone Tissue Regeneration. **Tissue Eng Part B Rev.**, v. 18, n. 1, p. 24–39, 2012.

WANG, X. et al. Silk coatings on PLGA and alginate microspheres for protein delivery. **Biomaterials**, v. 28, p. 4161–4169, 2007.

WAYS, T. M. M.; LAU, W. M. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. **Polymers**, v. 10, p. 1–37, 2018.

WOOD, B. G. C.; KEECH, M. K. The Formation of Fibrils from Collagen Solutions *. **Bochemicals**, v. 75, p. 588–598, 1960.

XIN, M.; OLSON, E. N.; BASSEL-DUBY, R. Mending broken hearts : **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, n. July, p. 1–13, 2013.

XING, Y. et al. Engineered myocardial tissues constructed in vivo using cardiomyocyte-like cells derived from bone marrow mesenchymal stem cells in rats. **Journal of Biomedical Science**, v. 19, n. 6, p. 1–11, 2012.

YANG, T. L. Chitin-based materials in tissue engineering: Applications in soft tissue

and epithelial organ. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 3, p. 1936–1963, 2011.

YE, K. Y.; BLACK, L. D. Strategies for Tissue Engineering Cardiac Constructs to Affect Functional Repair Following Myocardial Infarction. **J. of Carciovasc. Trasns. Res**, v. 4, p. 575–591, 2011.

YUE, J. et al. BMP2 gene delivery to bone mesenchymal stem cell by chitosan-g-PEI nonviral vector. **Nanoscale Research Letters**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

ZHANG, J. et al. Chitosan Modification and Pharmaceutical / Biomedical. **Marina Drugs**, v. 8, n. 1, p. 1962–1987, 2010.

ZHANG, L.; HU, J.; ATHANASIOU, K. A. The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration. **Crit Rev Biomed Eng**, v. 37, n. 530, p. 1–44, 2011.

ZHANG, Z.; LI, G.; SHI, B. I. Physycochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, v. 9, p. 23–28, 2006.

ZORNOFF, L. A. M. et al. Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction : Concepts and Clinical Implications. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 92, n. 2, p. 150–156, 2008.