# UNIVERSIDADE DE SOROCABA PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Juliana Ferreira de Souza

# SCAFFOLD ACELULAR FUNCIONALIZADO COM CRISTAL LÍQUIDO LIOTRÓPICO PARA CONDUTIVIDADE DO IMPULSO ELÉTRICO: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MECÂNICA E FÍSICO-QUÍMICA

Sorocaba/SP

Juliana Ferreira de Souza

# SCAFFOLD ACELULAR FUNCIONALIZADO COM CRISTAL LÍQUIDO LIOTRÓPICO PARA CONDUTIVIDADE DO IMPULSO ELÉTRICO: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MECÂNICA E FÍSICO-QUÍMICA

Tese aprovada pela Banca examinadora do 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 2021

# Ficha Catalográfica

8715d	Souza, Juliana Ferreira de <i>Scaffold</i> acelular funcionalizado com cristal líquido liotrópico para condutividade do impulso elétrico : caracterização morfológica, mecânica e físico-química / Juliana Ferreira de Souza. – 2021. 146 f. : il.
	Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2021.
	<ol> <li>Materiais biomédicos. 2. Infarto do miocárdio. 3. Engenharia biomédica. I. Chaud, Marco Vinícius, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.</li> </ol>

Elaborada por Maria Carla P. F. Gonçalves - CRB-8/6721

#### Juliana Ferreira de Souza

# SCAFFOLD ACELULAR FUNCIONALIZADO COM CRISTAL LÍQUIDO LIOTRÓPICO PARA CONDUTIVIDADE DO IMPULSO ELÉTRICO: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MECÂNICA E FÍSICO-QUÍMICA

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovada em: 03/03/2021.

#### **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud Universidade de Sorocaba (UNISO)

ane fry M

Profa. Dra. Ana Luíza Garcia Millás Massaguer 3D Biotechnology Solutions (3DBS)

Renato Grillo

Prof. Dr. Renato Grillo Universidade Estadual Paulista (UNESP - Campus de Ilha Solteira)

Manfadyleis

Profa. Dra. Moema de Alencar Hausen Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP - Campus Sorocaba)

101 /1

Prof. Dr. Norberto Aranha Universidade de Sorocaba (UNISO)

### AGRADECIMENTOS

Dedico neste espaço meus sinceros agradecimentos àqueles que foram importantes durante essa trajetória. Em primeiro lugar, agradeço Deus pela minha trajetória, vida, saúde, família e por nunca ter me deixado perder a fé.

Aos meus pais Renê e Janete, muito obrigada! Vocês não imaginam o quanto me orgulho por ter vocês como pais, e são meus maiores exemplos de vida. Agradeço pelos conselhos, força, fé e sabedoria. Pai e Mãe, muito obrigada por não medirem esforços pela minha felicidade e por sempre guiarem meu caminho. Amo vocês!

As minhas irmãs Liliane e Mariana, vocês são muito especiais! Obrigada por poder compartilhar todo os momentos e por estar sempre presentes. Minha sobrinha Duda, obrigada por me ajudar, mesmo quando não sabe que está ajudando rs, você é uma menina que traz luz e é nosso melhor presente desde 2014. Tia Ju ama estar contigo, sua alegria e sorriso enche meu coração de esperança e amor. Ao Jonathan, muito obrigada pelo apoio, por me ajudar a ter esperança, paciência e momentos felizes nesse processo de finalização. Te amo!

Agradeço aos meus cunhados, avós e todos os meus familiares. Amo vocês!

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud, agradeço pela orientação desde a graduação. Sou grata por compartilhar suas experiências! Agradeço ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia da UNISO (LaBNUS) e todos que já fizeram e fazem parte. Obrigada pelas amizades, experiências e companhias diárias no laboratório!

À Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP - Campus Sorocaba), Laboratório de Biomateriais e Prof. Dr. Daniel Komatsu pelo suporte durante avaliação morfológica do cristal líquido liotrópico, usando microscopia de luz polarizada.

Ao Laboratório de Física Nuclear Aplicada da UNISO (LAFINAU), Laboratório de Processamento de Imagens e Sinais da UNISO (LAPISUS), Prof. Dr. José Martins de Oliveira Junior e Denicezar Angelo Baldo pelas análises de microtomografia computadorizada tridimensional e microscopia eletrônica de varredura.

Ao Prof. Dr. Norberto Aranha por gentilmente ter cedido os casulos do bicho-da-seda.

À Universidade de Sorocaba (UNISO) pela recepção e suporte desde a graduação.

À empresa Kerry por gentilmente ter cedido as monoleínas (Myverol 18-92<sup>®</sup> e Myverol 18-99<sup>®</sup>).

À Capes pelo apoio financeiro, oferecido pela bolsa do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições Comunitárias de Educação Superior (PROSUC/CAPES).

Gratidão! ♥

"O tempo muito me ensinou: Ensinou a amar a vida, não desistir de lutar, renascer na derrota, renunciar às palavras e pensamentos negativos, acreditar nos valores humanos, e a ser otimista. Aprendi que mais vale tentar do que recuar, antes acreditar do que duvidar, que o que vale na vida, não é o ponto de partida e sim a nossa caminhada."

(Cora Coralina)

#### **RESUMO**

**INTRODUÇÃO:** As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte após lesões causadas pelo infarto do miocárdio. Assim, alternativas terapêuticas que visem a recuperação funcional do tecido cardíaco, tem sido amplamente estudadas. OBJETIVO: O objetivo desse estudo foi desenvolver, caracterizar e avaliar scaffold funcionalizado com cristal líquido liotrópico (CLL) para promover condutividade do impulso elétrico no tecido cardíaco, após lesões causadas por infarto do miocárdio. MÉTODOS: A obtenção do scaffold funcionalizado incluem: (i) obtenção das formulações de CLL, usando monoleína (Myverol 18-92 ou Myverol 18-99) como fase oleosa, água ultrapura como fase aquosa e Poloxamer 407<sup>®</sup> como hidrótropo; (ii) fabricação de scaffold acelular usando colágeno tipo I, ácido hialurônico, fibroína da seda, Poloxamer 407® e agentes reticulantes, e (iii) a obtenção do scaffold funcionalizado pela incorporação das formulações de CLL no scaffold acelular (Scaffold-CLL). O Scaffold-CLL foi caracterizado por propriedades mecânicas, estudo de intumescimento, desintegração e condutividade elétrica, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), microtomografia computadorizada tridimensional (µCT) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). **RESULTADOS:** A técnica de compressão plástica aplicada permitiu obter scaffold funcionalizado com CLL com resistência mecânica adequada. A capacidade de intumescimento e perfil de desintegração foram influenciados pela composição e grau de reticulação das formulações. O scaffold-CLL apresenta propriedade semicondutora, com potencial de aplicação no tecido cardíaco lesionado que pode influenciar na condução e propagação de estímulo mioelétrico. O FTIR e DSC indicaram, respectivamente, que houve interação química e mistura miscível entre os componentes das formulações. A µCT e MEV confirmaram, respectivamente, a orientação anisotrópica e formação estrutural dos poros. **CONCLUSÃO:** Os *Scaffold*-CLL obtidos são matrizes tridimensionais porosas, com orientação anisotrópica e propriedade semicondutora, com possibilidade de atuar como suporte temporário e influenciar positivamente na recuperação funcional do tecido cardíaco, após lesões causadas por infarto do miocárdio.

**Palavras-chave:** Infarto do miocárdio; Engenharia de tecidos; *Scaffold* acelular; Sistema biomimético; Cristal líquido liotrópico.

## ABSTRACT

INTRODUCTION: Cardiovascular diseases are the main causes of death after injuries caused by myocardial infarction. Thereby, therapeutic alternatives aimed at the functional recovery of cardiac tissue have been widely studied. **OBJECTIVE:** The aim of this study was to develop, characterize and evaluate functionalized scaffold with lyotropic liquid crystal (LLC) to promote conductivity of the electrical impulse and application to cardiac tissue, after injuries caused by myocardial infarction. METHODS: Obtaining functionalized scaffold include: (i) obtaining LLC formulations, using monoolein (Myverol 18-92<sup>®</sup> or Myverol 18-99<sup>®</sup>) as oil phase, ultrapure water as aqueous phase and Poloxamer 407<sup>®</sup> as hydrotrope; (ii) making acellular scaffold using type I collagen, hyaluronic acid, silk fibroin, Poloxamer 407® and crosslinking agents, and (iii) obtaining functionalized scaffold by incorporating LLC formulations into the acellular scaffold (Scaffold-LLC). The Scaffold-LLC was characterized by mechanical properties, study of swelling, disintegration and electrical conductivity, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), threedimensional computed microtomography (µCT) and scanning electron microscopy (SEM). **RESULTS:** Applied plastic compression technique allowed to obtain functionalized scaffold with LLC with adequate mechanical resistance. The swelling capacity and disintegration profile were influenced by composition and degree of crosslinking of formulations. The scaffold-LLC has semiconductor properties, with potential to application to injured cardiac tissue that may influence the conduction and propagation of myoelectric stimuli. The FTIR and DSC indicated, respectively, that there was chemical interaction and miscible mixture between the components of formulations. The µCT and SEM confirmed, respectively, anisotropic orientation and structural pores formation. CONCLUSION: The Scaffold-LLC obtained are three-dimensional porous matrices, with anisotropic orientation and semiconductor property, with possibility of act as temporary support and positively influencing the functional recovery of cardiac tissue, after injuries caused by myocardial infarction.

**Keywords:** Myocardial infarction; Tissue engineering; Acellular scaffold; Biomimetic systems; Lyotropic liquid crystal.

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Corte histológico do músculo estriado cardíaco20
Figura 2 - Representação esquemática da ação dos íons durante a contração muscular
cardíaca20
Figura 3 - Imagem ilustrativa do coração e miocárdio em corte histológico longitudinal pós-
IM21
Figura 4 - Fluxograma da classificação dos polifenóis baseados no tipo dos fitoquímicos
fenólicos27
Figura 5 - Representação esquemática do comportamento molecular e das transições de fases
entre o sólido cristalino, cristal líquido e líquido isotrópico
Figura 6 - Representação esquemática dos três diferentes ordenamentos estruturais do cristal
líquido liotrópico classificados como (A) lamelar, (B) hexagonal e (C) cubico33
Figura 7 - Fluxograma esquemático da obtenção, caracterização e seleção das formulações de
cristal líquido liotrópico
Figura 8 - Representação esquemática do processo de preparação das formulações de cristal
líquido liotrópico40
Figura 9 - Diagrama ternário de fases 1 (A) e Diagrama ternário de fases 2 (B) das
formulações de cristal líquido liotrópico (F1-F36) obtidas com monoleína 18-92,
água ultrapura e poloxamer $407^{\ensuremath{\$}}$ (DT1) e monoleína 18-99, água ultrapura e
poloxamer 407 <sup>®</sup> (DT2)43
Figura 10 - Resultados das imagens micrográficas das formulações de cristal líquido
liotrópico por microscopia de luz polarizada após 24 horas
Figura 11 - Resultados das medidas de potencial zeta das formulações de cristal líquido
liotrópico (DT1-F6, DT1-F15, DT1-F20, DT1-F21 e DT2-F21) durante 30 dias 48
Figura 12 - Resultados das medidas de diâmetro de partículas das formulações de cristal
líquido liotrópico (DT1-F6, DT1-F15, DT1-F20, DT1-F21 e DT2-F21) durante
30 dias
Figura 13 - Resultados das medidas do índice de polidispersidade das formulações de cristal
líquido liotrópico (DT1-F6, DT1-F15, DT1-F20, DT1-F21 e DT2-F21) durante
30 dias
Figura 14 - Resultados dos espectros dos componentes das formulações (MO-18-92, MO-18-
99 e P407) e formulações de CLL (DT1-F6, DT1-F21 e DT2-F21) avaliados por
FTIR

Figura 15	- Resultados dos termogramas dos componentes das formulações e formulações de
	CLL avaliados por DSC
Figura 16	- Fluxograma esquemático da obtenção, caracterização e seleção dos scaffolds
	acelulares
Figura 17	- Etapas do processo para obtenção dos <i>scaffolds</i> acelulares62
Figura 18	- Resultados das propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i> acelulares (FA-FD)64
Figura 19	- Resultados das imagens morfológicas dos scaffolds acelulares (FA-FD) avaliados
	por microtomografia computadorizada tridimensional65
Figura 20	- Resultados das imagens microscópicas dos scaffolds acelulares (FA-FD) com
	magnificação de 100x e 250x caracterizadas por MEV67
Figura 21	- Resultados dos espectros dos (A) componentes das formulações (COL, AH, FS e
	P407) e (B) scaffolds acelulares (FA-FD) avaliados por FTIR68
Figura 22	- Resultados das curvas dos termogramas dos (A) componentes das formulações
	(COL, AH, SF e P407) e os <i>scaffolds</i> acelulares (B) avaliados por DSC69
Figura 23	- Fluxograma esquemático da obtenção, caracterização e seleção dos scaffolds
	acelulares otimizados75
Figura 24	- Resultados macroscópicos das amostras de (A) hidrogel e (B) scaffolds acelulares
	(RA-RC e DA-DC)
Figura 25	- Resultados das propriedades mecânicas dos scaffolds acelulares com polifenóis
	isolados do suco da romã em meio aquoso (RA-RC) avaliados por texturômetro 80
Figura 26	- Resultados das propriedades mecânicas dos scaffolds biomimético acelulares com
	difenil fosforil azida (DA-DC) avaliados por texturômetro
Figura 27	- Resultados da capacidade de intumescimento da (A) estrutura completa (matriz e
	sistema de poros) e do (B) próprio material (matriz) dos scaffolds com polifenóis
	isolados do suco da romã em meio aquoso (RA-RC)82
Figura 28	- Resultados da capacidade de intumescimento da (A) estrutura completa (matriz e
	sistema de poros) e do (B) próprio material (matriz) dos scaffolds com difenil
	fosforilazida (DA-DC)83
Figura 29	- Resultados do (A) perfil de desintegração e (B) medidas de pH no estudo de
	desintegração dos scaffolds acelulares com polifenóis isolados do suco da romã
	em meio aquoso (RA-RC)
Figura 30	- Resultados do (A) perfil de desintegração e (B) medidas de pH no estudo de
	desintegração dos scaffolds acelulares com difenil fosforil azida (DA-DC)86

Figura 31	- Resultados dos espectros dos (A) componentes das formulações (COL, AH, SF,
	P407, PSR e DPPA) e (B) scaffolds acelulares (RA-RC e DA-DC) avaliados por
	FTIR
Figura 32	- Resultados dos espectros dos (A) componentes das formulações (COL, AH, SF,
	P407, PSR e DPPA) e (B) scaffolds acelulares e mistura física (RC e DC)
	avaliados por FTIR
Figura 33	- Resultados dos termogramas (A) componentes das formulações (COL, AH, SF,
	P407, PSR e DPPA) e (B) scaffolds acelulares (RA-RC e DA-DC) avaliados por
	DSC
Figura 34	- Resultados dos termogramas dos (A) componentes das formulações (COL, AH,
	SF, P407, PSR e DPPA) e (B) scaffolds acelulares e mistura física (RC e DC)
	avaliados por DSC
Figura 35	- Resultados das imagens microscópicas dos scaffolds acelulares (RC e DC) com
	magnificação de 100x, 250x e 500x avaliados por MEV93
Figura 36	- Resultados das características morfológicas dos <i>scaffolds</i> acelulares (RC e DC)
	avaliados por microtomografia computadorizada tridimensional94
Figura 37	- Fluxograma esquemático da obtenção, caracterização e seleção dos Scaffold-CLL
Figura 38	- Resultados macroscópicos das amostras de (A) hidrogel e (B) Scaffold-CLL103
Figura 39	- Resultados das propriedades mecânicas dos <i>Scaffold-CLL</i> 104
Figura 40	- Resultados da capacidade de intumescimento da (A) estrutura completa (matriz e
	sistema de poros) e do (B) próprio material (matriz) dos Scaffolds-CLL106
Figura 41	- Resultados do (A) perfil de desintegração e (B) medidas de pH no estudo de
	desintegração dos Scaffolds-CLL
Figura 42	- Resultados da capacidade de condutividade elétrica dos Scaffolds-CLL avaliados
	por condutivímetro
Figura 43	- Resultados dos espectros dos (A) componentes das formulações e (B) Scaffolds-
	CLL avaliados por FTIR111
Figura 44	- Resultados dos termogramas dos (A) componentes das formulações e (B)
	Scaffold-CLL avaliados por DSC
Figura 45	- Resultados das características morfológicas do Scaffold-CLL avaliado por
	microtomografia computadorizada tridimensional116
Figura 46	- Resultados das imagens microscópicas dos Scaffolds-CLL com magnificação de
	100x, 250x e 500x avaliados por MEV118

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporção das formulações obtidas para projeção das formulações de cristal
líquido liotrópico para construção do diagrama ternário de fases
Tabela 2 - Resultados de anisotropia e presença de lamelas e/ou cristal líquido liotrópico nas
formulações do diagrama ternário de fases 1 avaliados por microscopia com luz
polarizada44
Tabela 3 - Resultados de anisotropia e presença de lamelas e/ou cristal líquido liotrópico nas
formulações do diagrama ternário de fases 2 avaliados por microscopia com luz
polarizada45
Tabela 4 - Resultados da temperatura de fusão e entalpia de calorimétrica dos componentes
das formulações e formulações de CLL avaliados por DSC52
<b>Tabela 5</b> - Composição das formulações dos scaffolds acelulares (FA-FD)
Tabela 6 - Resultados numéricos das características morfométricas dos scaffolds acelulares
(FA-FD) avaliados por microtomografia computadorizada tridimensional65
Tabela 7 - Resultados numéricos dos picos, início, final e entalpia calorimétrica dos scaffolds
acelulares (FA-FD) por DSC70
Tabela 8 - Composição das formulações dos scaffolds acelulares otimizados (RA-RC e DA-
DC)
Tabela 9 - Resultados numéricos dos picos, início, final e entalpia calorimétrica dos scaffolds
acelulares (RA-RC e DA-DC) avaliados por DSC91
Tabela 10 - Resultados numéricos das características morfométrica dos scaffolds acelulares
(RC e DC) avaliados por microtomografia computadorizada tridimensional95
<b>Tabela 11 -</b> Composição das formulações dos Scaffold-CLL101
Tabela 12 - Resultados numéricos dos picos, início, final e entalpia calorimétrica do Scaffold-
CLL avaliado por DSC114
Tabela 13 - Resultados numéricos das características morfométricas do Scaffold-CLL
avaliados por microtomografia computadorizada tridimensional115

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AH Ácido hialurônico
- COL Colágeno bovino tipo I
- CLL Cristal líquido liotrópico
- DP Desvio padrão
- DPPA Difenil fosforil azida
- DSC Calorimetria exploratória diferencial
- DT1 Diagrama ternário de fases 1 (MO-18-92)
- DT2 Diagrama ternário de fases 2 (MO-18-99)
- FS Fibroína da seda
- FTIR Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
- IM Infarto do miocárdio
- LO Sistema com aspecto líquido opaco
- LT- Sistema com aspecto líquido translúcido
- MEC Matriz extracelular
- MEV Microscopia eletrônica de varredura
- MO-18-92 Myverol 18-92®
- MO-18-99 Myverol 18-99®
- P407 Poloxamer 407®
- Pós-IM Pós-Infarto do miocárdio
- PSR Polifenóis isolado do suco da romã
- Scaffold-CLL Scaffold funcionalizado com cristal líquido liotrópico
- Scans Número de varreduras
- SF Sistema com separação de fases
- VO Sistema com aspecto viscoso opaco
- VT Sistema com aspecto viscoso opaco
- ΔH Entalpia calorimétrica
- 3D Tridimensional
- $\mu CT$  Microtomografia computadorizada

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
CAPÍTULO I	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Doenças cardiovasculares	19
3.2 Recuperação do tecido cardíaco	22
3.3 Scaffolds	23
3.4 Componentes aplicados na formulação do <i>scaffold</i> acelular	26
3.4.1 Colágeno	26
3.4.2 Polifenóis isolados do suco da romã (Punica granatum L.)	27
3.4.3 Difenil fosforil azida	28
3.4.4 Ácido hialurônico	29
3.4.5 Fibroína da seda	29
3.4.6 Copolímero anfifílico	30
3.5 Cristal líquido liotrópico	31
3.6 Componentes aplicados na formulação de cristal líquido liotrópico	34
3.6.1 Monoleína	34
3.6.2 Copolímero anfifílico	34
3.7 conclusões	35
CAPÍTULO II	36
4 OBTENÇÃO DE CRISTAL LÍQUIDO LIOTRÓPICO BASEADO EM DIAGRA TERNÁRIO DE FASES: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, ESTUDO ESTABILIDADE TERMODINÂMICA E AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	.MA DE 37
4.1 Resumo gráfico	37
4.2 Introdução	37
4.3 Delineamento experimental	38
5 MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1 Material	38
5.2 Métodos	38

5.2.1 Preparação das formulações de cristal líquido liotrópico baseado em diagrama ternário de fases como superfície de resposta
5.2.2 Seleção das formulações de cristal líquido liotrópico40
5.2.3 Potencial zeta, diâmetro de partícula e índice de polidispersidade
5.2.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)41
5.2.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)
5.2.6 Análises estatísticas
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO42
6.1 Obtenção e seleção das formulações de cristal líquido liotrópico
6.2 Potencial zeta, diâmetro de partícula e índice de polidispersidade47
6.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)50
6.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)
7 CONCLUSÕES
CAPÍTULO III
8 <i>SCAFFOLD</i> ACELULAR OBTIDO POR COMPRESSÃO PLÁSTICA: AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICA, MECâNICA E MORFOLÓGICA
8.1 Resumo gráfico
8.2 Introdução
8.3 Delineamento experimental
9 MATERIAL E MÉTODOS
9.1 Material
9.2 Métodos
9.2.1 Processo de extração da fibroína da seda (Bombyx mori)
9.2.2 Preparação e obtenção dos <i>scaffolds</i> acelulares
9.2.3 Propriedades mecânicas
9.2.4 Características morfométricas
9.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)60
9.2.6 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)60
9.2.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)60
9.2.8 Estudo de intumescimento60
9.2.9 Estudo de desintegração61
9.2.10 Análises estatísticas
10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1 Obtenção dos scaffolds acelulares	62
10.2 Propriedades mecânicas	63
10.3 Características morfométricas	64
10.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	66
10.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	67
10.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	69
10.7 Estudo de intumescimento e desintegração	71
11 CONCLUSÕES	72
CAPÍTULO IV	73
12 OTIMIZAÇÃO DO <i>SCAFFOLD</i> ACELULAR OBTIDO POR COMPRI PLÁSTICA: AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MECÂNICA E MORFOLÓGIO	ESSÃO CA74
12.1 Resumo gráfico	74
12.2 Introdução	74
12.3 Delineamento experimental	75
13 MATERIAL E MÉTODOS	75
13.1 Material	75
13.2 Métodos	76
13.2.1 Processo de extração da fibroína da seda (Bombyx mori)	76
13.2.2 Processo de isolamento de polifenóis do suco da romã (Punica granatum L.)	76
13.2.3 Preparação e obtenção dos scaffolds acelulares otimizados	76
13.2.4 Propriedades mecânicas	77
13.2.5 Estudo de intumescimento	77
13.2.6 Estudo de desintegração	77
13.2.7 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	78
13.2.8 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	78
13.2.9 Seleção das formulações dos scaffolds acelulares	78
13.2.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	78
13.2.11 Características morfométricas	78
13.2.12 Análise estatística	78
14 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
14.1 Obtenção dos scaffolds acelulares otimizados	79
14.2 Propriedades mecânicas	79
14.3 Estudo de intumescimento	82
14.4 Estudo de desintegração	84

14.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).	
14.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	
14.7 Seleção dos scaffolds acelulares otimizados	
14.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	
14.9 Características morfométricas	
15 CONCLUSÕES	
CAPÍTULO V	
16 ASSOCIAÇÃO DE CRISTAL LÍQUIDO LIOTRÓPICO COM ACELULAR PARA APLICAÇÃO NO TECIDO CARDÍACO	SCAFFOLD 98
16.1 Resumo gráfico	
16.2 Introdução	
16.3 Delineamento experimental	
17 MATERIAL E MÉTODOS	
17.1 Material	
17.2 Métodos	
17.2.1 Preparação e obtenção dos Scaffold-CLL	
17.2.2 Propriedades mecânicas	
17.2.3 Estudo de intumescimento	
17.2.4 Estudo de desintegração	
17.2.5 Estudo de condutividade elétrica	
17.2.6 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	
17.2.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	
17.2.8 Características morfométricas	
17.2.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	
17.2.10 Análises estatísticas	
18 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
18.1 Obtenção do scaffold funcionalizado	
18.2 Propriedades mecânicas	
18.3 Estudo de intumescimento	
18.4 Estudo de desintegração	
18.5 Estudo de condutividade elétrica	
18.6 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).	
18.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	
18.8 Características morfométricas	

18.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	
19 CONCLUSÕES	
20 PERSPECTIVAS FUTURAS	
21 REFERÊNCIAS	
22 ANEXO A	

# 1 INTRODUÇÃO

O cristal líquido liotrópico (CLL) é considerado como sistema biomimético, que pode se apresentar em diferentes arquiteturas formadas pela auto-organização dos lipídios em meio aquoso. Essa auto-organização é dependente do equilíbrio entre as forças intermoleculares, que promove uma estrutura espacialmente regular, e sua estabilidade física dependente do equilíbrio entre as fases aquosa e lipídica.

Qualquer alteração do equilíbrio em função do pH, temperatura ou taxa de concentração, pode influenciar ou interromper a forma de ordenamento do CLL, e esse ordenamento pode originar três diferentes tipos de morfologias, descritas como lamelar ou cruz de malta (L $\alpha$ ), hexagonal (H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>) ou cúbica (V<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>). Essas duas últimas morfologias (hexagonal e cúbica) também pode apresentar uma auto-organização classificada como fase reversa.

As propriedades comumente descritas para CLL são viscoelasticidade, estabilidade termodinâmica, potencial de liberação de fármacos (hidrofílico e lipofílico) e capacidade de condução de estímulos elétricos. Essas características do CLL são relevantes para funcionalizar o *scaffold* acelular, com projeção de aplicação na recuperação funcional do tecido cardíaco lesionado pós-infarto do miocárdio.

O *scaffold* funcionalizado com CLL (*Scaffold*-CLL) pode ser utilizado como estratégia promissora, para viabilizar a recuperação tecidual e funcional de áreas lesionadas a nível celular. O *Scaffold*-CLL foi composto por biomateriais, que mimetizem os principais componentes da matriz extracelular (MEC) e associado com CLL. Essa associação visa atuar sinergicamente, entre as características próprias do *scaffold* e a propriedade de condutividade de estímulos elétricos do CLL.

Neste estudo, o *Scaffold*-CLL foi desenvolvido pela (i) obtenção de CLL, usando monoleína (Myverol 18-92 ou Myverol 18-99) como fase oleosa, água ultrapura como fase aquosa e poloxamer 407<sup>®</sup> (P407) como hidrótropo; (ii) obtenção de *scaffold* acelular, usando colágeno tipo I, ácido hialurônico, fibroína da seda, P407 e agentes reticulantes, e por fim promover a (iii) associação entre *scaffold* acelular e CLL, formando o *scaffold* funcionalizado (*Scaffold*-CLL).

O presente trabalho foi elaborado em forma de capítulos e inclui o Capítulo I que aborda uma revisão bibliográfica sobre o tema central desse trabalho, apresentando um estudo do estado geral das doenças cardiovasculares, infarto do miocárdio, recuperação do tecido cardíaco, CLL, *scaffold* acelular e componentes usados para compor as formulações.

O Capítulo II descreve sobre obtenção de CLL e caracterização por avaliação morfológica, estudo de estabilidade termodinâmica e físico-química. O desenvolvimento de CLL foi baseado em diagrama ternário de fases, obtendo uma superfície de resposta para auxiliar na seleção das melhores formulações precursoras de CLL.

O Capítulo III descreve sobre estudo da influência do ácido hialurônico no *scaffold* acelular obtido por compressão plástica e avaliados por propriedades físico-química, mecânica e morfológica. O *scaffold* acelular desenvolvido foi caracterizado como matriz tridimensional porosa com orientação anisotrópica.

O Capítulo IV descreve a otimização do *scaffold* acelular obtido por compressão plástica caracterizado por avaliação físico-química, propriedades mecânicas, estudo de intumescimento, estudo de desintegração e avaliação morfológica. Neste capítulo, a formulação previamente selecionada (Capítulo III) foi otimizada pelo (i) aumento da concentração de fibroína e (ii) adição dos agentes reticulantes (polifenóis isolados do suco da romã ou difenil fosforil azida).

O Capítulo V compreende sobre estudo de *scaffold* funcionalizado com CLL (*Scaffold*-CLL) para aplicação no tecido cardíaco lesionado pós-infarto do miocárdio. *Scaffold*-CLL é uma matriz tridimensional porosa, com orientação anisotrópica e propriedade semicondutora. As propriedades mecânicas, estudo de intumescimento e desintegração foram influenciados pela composição e grau de reticulação das amostras do *Scaffold*-CLL.

# 2 **OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar *scaffold* funcionalizado com cristal líquido liotrópico com perspectiva para aplicação no tecido cardíaco lesionado pós-infarto do miocárdio.

# 2.2 Objetivos específicos

- > Desenvolver, avaliar e selecionar formulações de cristal líquido liotrópico;
- > Desenvolver, avaliar e selecionar formulações de *scaffold* acelular;
- > Preparar *scaffold* acelular funcionalizado com cristal líquido liotrópico;
- Avaliar as propriedades mecânicas do scaffold funcionalizado;
- > Avaliar as características físico-química e morfológica do *scaffold* funcionalizado;
- > Avaliar a condutividade elétrica do *scaffold* funcionalizado;
- > Avaliar o perfil de intumescimento e desintegração do *scaffold* funcionalizado.

# CAPÍTULO I

# **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Doenças cardiovasculares**

As doenças cardiovasculares ou cardiomiopatias são definidas como grupo de doenças cardíacas e/ou de vasos sanguíneos. Essas doenças são consideradas as principais causas de morbidade e mortalidade, com estimativa de 17,9 milhões de mortes por ano, representando 31% de todas as mortes. Dessas mortes 85% são causadas por infarto do miocárdio (IM) ou derrame pericárdico. Geralmente, as cardiomiopatias estão associadas pela disfunção mecânica ou elétrica que exibe hipertrofia ventricular inapropriada ou dilatação (BENJAMIN *et al.*, 2017; WHO, 2017).

O coração é um órgão complexo, que possui função de bombeamento sanguíneo para todos tecidos do corpo. Esse órgão é composto por cardiomiócitos (células musculares cardíacas), células musculares lisas, fibroblastos, vasos sanguíneos, nervos e componentes da matriz extracelular (MEC) (interstício cardíaco e colágeno) organizados e estruturados de modo específico. O comportamento e arranjo das células cardíacas influenciam diretamente na função mecânica e elétrica do coração, e qualquer alteração pode acarretar em desequilíbrio de suas funções nativas (KIERSZENBAUM; TRES, 2012; WALKER; SPINALE, 1999).

O tecido cardíaco é formado por três camadas, sendo (i) endocárdio, composto por um revestimento endotelial e tecido conjuntivo subendotelial; (ii) miocárdio, que é formado por três tipos de músculo cardíaco, sendo músculo atrial, músculo ventricular e fibras musculares condutoras; e (iii) epicárdio, revestido por um mesotélio voltado para o espaço pericárdico seroso, formando uma camada visceral do pericárdio (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

O músculo cardíaco é formado por células cilíndricas e ramificadas (10-20 µm de diâmetro e 80-100 µm de comprimento), com núcleo centralizado e ligados por discos intercalares. Esses discos intercalares são complexos juncionais, que promovem união intercelular nas fibras musculares, impedindo sua separação e a junção comunicante permite a passagem de íons entre as células, conduzindo uma rápida propagação de despolarização da membrana e sincronização da contração celular (MONTANARI, 2016). Essa organização estrutural e disposição do músculo estriado cardíaco é apresentada em corte histológico na Figura 1.



Figura 1 - Corte histológico do músculo estriado cardíaco

Nota: Corte histológico longitudinal do músculo estriado cardíaco corado em HE, com magnificação em 550x. Fonte: Adaptação de Montanari, (2016).

O miocárdio responde por estímulos pela despolarização da membrana, a qual é seguida pelo encurtamento dos elementos contráteis, terminando com relaxamento e retorno ao estado de repouso. As células cardíacas são interconectadas em grupos que respondem ao estímulo como unidade, se contraindo juntas quando uma única célula é estimulada. A contração das células cardíacas está diretamente relacionada com a concentração de cálcio livre (não ligado) no citosol (RAMÍREZ-RAMÍREZ, 2009; FINKEL; CUBEDDU; CLARK, 2010).

As células cardíacas são eletricamente excitáveis, com ritmo intrínseco, espontâneo e de longo potencial de ação que são divididos em quatro fases como (i) repolarização parcial; (ii) platô que ocorre quando os canais de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) apresentam uma corrente lenta para interior (despolarização), causando equilíbrio na saída de potássio (K<sup>+</sup>) (polarização); (iii) repolarização; e (iv) corrente espontânea que promove aumento da despolarização, resultando no aumento gradual da permeabilidade de Na<sup>+</sup>, e por isso, leva a célula ao limiar de um novo potencial de ação (FINKEL; CUBEDDU; CLARK, 2010). Essa atuação dos íons durante a contração muscular cardíaca está representada esquematicamente na Figura 2.



Figura 2 - Representação esquemática da ação dos íons durante a contração muscular cardíaca

Fonte: Adaptação de Finkel; Cubeddu; Clark, (2010).

O processo de contração muscular do tecido cardíaco pode ser dificultado ou interrompido quando ocorre alguma disfunção cardíaca como IM, descrito como doença cardíaca que causa morte celular (cardiomiócitos) e formação de cicatriz cardíaca. O IM ocorre devido obstrução da artéria coronária, decorrente de isquemia prolongada na área infartada do músculo cardíaco. Essa obstrução limita o fornecimento de sangue, causando hipóxia e falta de nutrientes (CHAUD *et al.*, 2017; SVYSTONYUK; MEWHORT; FEDAK, 2018). Na Figura 3 é apresentada a imagem ilustrativa do coração e tecido cardíaco em corte histológico pós-IM.

Figura 3 - Imagem ilustrativa do coração e miocárdio em corte histológico longitudinal pós-IM



Fonte: Imagens adaptadas e disponíveis em <https://www.mdsaude.com/cardiologia/infarto-fulminante/> e <http://anatpat.unicamp.br/lamdc9.html> Acesso em 30/03/2021.

O IM causa insuficiência de transporte sanguíneo para o tecido, levando a remodelação ventricular, fibrose, necrose ou causando insuficiência cardíaca que pode resultar em problemas cardíacos com disfunções parciais ou totais (RODRIGUES *et al.*, 2018). Quando ocorre IM, há formação de cicatriz que substitui o tecido contrátil, que por sua vez, não contribui para função de bombeamento cardíaco, não sendo mecanicamente funcional e prejudicando a qualidade e tempo de vida, decorrente à falha e insuficiência cardíaca (SVYSTONYUK; MEWHORT; FEDAK, 2018).

O coração com insuficiência cardíaca desenvolve três principais mecanismos compensatórios, sendo: (i) aumento da atividade simpática, que resulta em aumento da frequência e força de contração cardíaca; (ii) ativação do sistema renina-angiotensina, que causa aumento do volume sanguíneo, levando ao aumento da pressão venosa; e (iii) hipertrofia miocárdica, que causa aumento do tamanho e espessura do tecido cardíaco, ocorrendo uma diminuição da capacidade de relaxamento (FINKEL; CUBEDDU; CLARK, 2010).

De acordo com CHAUD *et al.*, (2017) nenhuma terapia descrita na literatura possui capacidade de impedir o avanço da fibrose cardíaca pós-IM, que visem preservar as funções cardíacas e atuando na prevenção da insuficiência cardíaca. Diante dessa condição, alguns gerenciamentos clínicos são comumente utilizados como terapia medicamentosa, terapia trombolítica, intervenção coronária percutânea e cirurgia de revascularização miocárdica, podendo auxiliar na sobrevivência de cerca de 85% dos pacientes no primeiro ataque cardíaco, mas tendo uma taxa de sobrevivência de 50% (BENJAMIN *et al.*, 2017; HASHIMOTO; OLSON; BASSEL-DUBY, 2018).

Por isso existe uma necessidade clínica de implementar novas terapias e estratégias, que visem a melhoria nas respostas deletérias pós-IM, que leva à insuficiência cardíaca, remodelação, arritmias e disfunção diastólica (FRANTZ; BAUERSACHS; ERTL, 2009). Apesar dos riscos, o tratamento mais recorrente no caso de insuficiência cardíaca tem sido o transplante cardíaco. Contudo, apesar da habilidade regenerativa restrita dos cardiomiócitos pós-IM, alguns estudos na área da medicina regenerativa vem se destacando, como uma estratégia promissora na melhoria e recuperação funcional cardíaca (MANGINI et al., 2015; TAYLOR; PARIKH; SAMPAIO, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2018).

Com os avanços e inovações vem sendo estudado, terapias celulares e acelulares para recuperação tecidual e funcional cardíaca. As terapias baseadas em células seguem dois modelos, sendo (i) cardiomioplastia e (ii) geração de um segmento cardíaco funcional para implantação sobre ou no coração (WENDEL *et al.*, 2015). Outro modelo de estudo em expansão está baseado na terapia acelular que utiliza *scaffold* acelular. Essa estratégia é fundamentada no efeito funcional do *scaffold* projetado criteriosamente, com base nos principais constituintes da MEC cardíaca (SEIF-NARAGHI *et al.*, 2013; SINGELYN *et al.*, 2009).

#### 3.2 Recuperação do tecido cardíaco

O corpo humano é um sistema complexo e tem uma área superficial muito grande, na qual a multiplicidade de interações baseadas em células, contribui para viabilidade e função de suas partes. A complexidade é, obviamente, a criação de um microambiente que favoreça as interações entre as células (interação alvo-celular) para propagação e compartilhamento de informações importantes, levando detalhes complexos que foram criteriosamente planejados (GUPTA *et al.*, 2016).

O tecido cardíaco, mais especificamente o miocárdio, tem apresentado uma incapacidade de auto renovação após lesões agudas, contudo existem estudos imunohistoquímico que identificaram células-tronco ou progenitoras específicas do tecido cardíaco, que são capazes de diferenciação celular específica de cardiomiócitos *in vitro*. Por isso, apesar do coração apresentar uma capacidade regenerativa limitada, a presença de populações de células progenitoras endógenas e exógenas podem permitir e mediar um processo de reparo tecidual, porém, esse mecanismo ainda não foi totalmente elucidado (LIAO *et al.*, 2008).

Dessa forma, há um crescente interesse em desenvolver novas abordagens para o tratamento pós-IM. A engenharia cardiovascular é considerada como alternativa promissora, para restaurar de modo estrutural e funcional o miocárdio adulto infartado, através da aplicação de uma matriz biológica tridimensional porosa, denominada como *scaffold* podendo ser aplicada sobre ou no interior do tecido lesionado (SERPOOSHAN; WU, 2014).

Algumas abordagens para o tratamento de fibrose cardíaca têm sido propostas e exploradas, tais como liberação sistêmica e alvo-específico de antifibróticos e aplicação de transplantes semipermanentes compostos por biomateriais funcionalizados. Esses transplantes semipermanentes podem atuar localizados a células progenitoras, visando controlar a fibrose cardíaca, e como resultado minimizar o estresse da parede ventricular e o processo inflamatório. Com isso, a seleção dos biomateriais com propriedades físicas, químicas, mecânicas e semicondutora é considerado um fator crítico na diminuição do estresse da parede ventricular e processo inflamatório, causado pela fibrose cardíaca (CHAUD *et al.*, 2017).

Esses biomateriais devem promover elasticidade e rigidez correspondente ao tecido cardíaco. A desintegração desse material deve ocorrer de maneira lenta e simultânea, para facilitar e viabilizar a interpenetração das células do tecido circundante na área lesionada, e atenuar a fibrose cardíaca. Portanto, o desenvolvimento de novas abordagens translacionais para melhorar a eficácia terapêutica, é essencial para promover terapias de antifibrose cardíaca (ARNAL-PASTOR *et al.*, 2013; CHAUD *et al.*, 2017).

## 3.3 Scaffolds

No tecido nativo, o crescimento celular e desenvolvimento estrutural é suportado pela MEC, que auxilia consistentemente na coordenação da contratilidade e manutenção da forma e tamanho cardíaco, bem como, a função dos cardiomiócitos. As interações comuns e a troca de informações orquestrada entre as células associadas ao contexto temporal e espacial,

precisa de apresentação sistemática de biomoléculas e biomateriais capazes de promover sinais biomoleculares (SOUZA *et al.*, 2017). O tamanho, forma e propriedades mecânicas das células são essenciais para uma apresentação adequada desses sinais e, assim, estimular uma resposta adequada e orientar na projeção para construção de *scaffolds* capazes de induzir uma orquestração celular (BALMERT; LITTLE, 2012).

Os *scaffolds* são estruturas tridimensionais usadas na área de medicina regenerativa para promover formação de um novo tecido (LIU; HOLZWARTH; MA, 2012). Os *scaffolds* devem atender alguns requisitos como ser (i) biocompatível e biodegradável; (ii) possuir superfície porosa e tridimensional, com poros uniformes e interconectados; (iii) possuir integridade mecânica para apoiar o reparo tecidual; e (iv) ter a superfície química e topográfica apropriada para interagir com as células. Além disso, deve mimetizar os aspectos físico-químicos, bem como, desempenhar as funções e possuir propriedades mecânica semelhantes do tecido a ser reparado (BAOLIN; PETER X., 2014; SERPOOSHAN *et al.*, 2013).

Os *scaffolds* podem ser desenvolvidos com células (*scaffolds* celulares) ou com ausência de células (*scaffolds* acelulares) podendo ser biologicamente ativo ou não, tendo como principal função ser suporte temporário para que ocorra migração, adesão e proliferação celular, e produção de MEC endógena para promover reparo e substituição tecidual no interior da cicatriz cardíaca (HUGHES *et al.*, 2016).

Os *scaffolds* celulares apresentam vantagem de reduzir a remodelação da parede ventricular, promover suporte mecânico e vascularização melhorada, e suas desvantagens são disponibilidade limitada de implantação, potencial de resposta imunogênica, alto custo e validade reduzida. As vantagens dos *scaffolds* acelulares são redução da remodelação da parede ventricular, disponibilidade imediata de implantação, resposta imunogênica limitada, baixo custo e validade prolongada, e suas desvantagens são vascularização limitada, interação limitada com a célula hospedeira e estabilidade mecânica variável (SVYSTONYUK; MEWHORT; FEDAK, 2018).

O principal desafio no desenvolvimento dos *scaffolds* está na projeção de um microambiente tridimensional acelular biologicamente compatível, altamente poroso com sistema de poros interligados, que favoreça o transporte de nutrientes, produtos metabólicos e estabilidade mecânica. Esse microambiente é capaz de mimetizar a MEC e atuar como análogo do tecido a ser reparado, estimulando respostas específicas em nível celular e assim, permitindo a formação de um novo tecido (LEE; MOONEY, 2001; PARK et al., 2011; LIU; HOLZWARTH; MA, 2012).

A projeção de *scaffolds* acelulares cardíacos precisa enfrentar alguns desafios, como controlar o alinhamento estrutural das células cardíacas (cardiomiócitos). Com isso, alguns estudos têm focado as suas estratégias nos efeitos interativos da orientação por contato, com estimulação e indução elétrica sobre a elongação e orientação dos cardiomiócitos, nas superfícies tridimensionais dos *scaffolds*. Além disso, as tentativas de reparo no miocárdio lesionado com recuperação endógena, requer uma organização orquestrada de vários tipos de células, incluindo cardiomiócitos, células estaminais locais e periféricas (KATZ *et al.*, 2014; NGUYEN *et al.*, 2010).

A arquitetura dos *scaffolds* acelulares cardíacos e escolha dos biomateriais é considerado um fator crítico, para recuperação de tecido cardíaco. Os diferentes processos usados na fabricação dos *scaffolds* podem modificar as propriedades de superfície, influenciar na arquitetura e similaridade do *scaffold* com tecido nativo, e fornece uma superfície bioativa. Portanto, a composição química e propriedades do microambiente tridimensional poroso, desempenham características primordiais para a interação entre célula e *scaffold* (*ALVES et al.*, 2018; SERPOOSHAN *et al.*, 2013).

Nesta linha de raciocínio, o microambiente fornecido por um *scaffold* criteriosamente planejado, pode suportar a diferenciação e a organização celular, além de prevenir a morte precoce de células que são dependentes de ancoragem. Os biomateriais podem atrair células do tecido nativo, e quando funcionalizados servir de ancoragem para as células dependentes de fixação. Assim, na aplicação da engenharia de tecido, os biomateriais que mais que destacam são os biopolímeros, por mimetizarem a MEC. A aplicação de biomateriais que sejam análogos da MEC é menos prejudicial para as células, devido preservar a viabilidade, função e identidade fenotípica (RANE; CHRISTMAN, 2011; SARIG; MACHLUF, 2011).

Além da escolha criteriosa dos biomateriais para compor as formulações dos *scaffolds*, também é importante definir o método e a técnica de fabricação mais adequada, pois a forma como o *scaffold* é obtido pode influenciar no seu desempenho e aplicação. Os métodos mais comumente descritos evolvem a aplicação de calor, pressão, dissolução de solvente orgânico e congelamento seguido de liofilização, com a finalidade de delinear a estrutura do biomaterial no formato desejado. Apesar de cada técnica apresentar vantagens e desvantagens, a escolha do método mais adequado será definido pela aplicação do *scaffold*, onde o biomaterial deverá apresentar os requisitos necessários e característicos do tecido a ser reparado (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011).

## 3.4 Componentes aplicados na formulação do scaffold acelular

#### 3.4.1 Colágeno

O colágeno (COL) é um polímero natural, sendo uma das proteínas mais abundantes e responsáveis pela manutenção da integridade estrutural de vertebrados e outros organismos multicelulares. O COL tipo I representa cerca de 80% da MEC no tecido cardíaco, tornando a escolha de preferência no desenvolvimento de *scaffold* acelular cardíaco (SVYSTONYUK; MEWHORT; FEDAK, 2018)

O COL tipo I é o mais encontrado na MEC dos tecidos conjuntivos, como tendão e osso, sendo mais amplamente usado e estudado na fabricação de biomateriais para aplicação na engenharia de tecidos, devido suas propriedades biodegradáveis, biocompatíveis, mecânicas e biológicas (RADHAKRISHNAN; NAGARAJAN; BECHELANY, 2020; USHA; SREERAM; MANDAL, 2013).

De acordo com Parenteau-bareil; Gauvin; Berthod, (2010), existem descritos cerca de 29 tipos de COL, que foram caracterizados e todos exibem uma estrutura típica de tripla hélice. Os tipos de COL I, II, III, V e XI são conhecidos por formar fibras de COL. As moléculas de COL são compostas por três cadeias α que se agrupam, devido à sua estrutura molecular e cadeias polipeptídicas. A chave do processo na formação das triplas hélices do COL, está na completa organização das cadeias simples de protocolágeno. A trimerização começa no C-terminal da cadeia, o qual são fixadas por ligações duplas-S, e formam um "zíper" na mesma direção da cadeia. Para o processo de trimerização, todos os aminoácidos devem estar na conformação trans, devido a forma cis dos aminoácidos (prolina e hidroxiprolina) serem energeticamente favorecidas (MEYER, 2019).

Os biomateriais obtidos com COL têm sido usados para diversas aplicações biomédicas, porém, podem apresentar algumas limitações como baixa resistência mecânica, baixa estabilidade térmica, alto perfil de desintegração e alta capacidade de intumescimento. Essas limitações podem ser superadas pela incorporação de agentes reticulantes, melhorando a estabilidade térmica, mecânica e integridade estrutural da molécula do COL, devido a associação do COL e agente reticulante promover um processo de reticulação (LAKRA *et al.*, 2014).

De acordo Radhakrishnan; Nagarajan; Bechelany, (2020), a reticulação é um processo crucial na estabilização das moléculas do COL, pois controlam as propriedades imunogênicas. A reticulação pode ocorrer por processos químicos, físicos ou biológicos, e são capazes de se conectar com o grupo funcional da cadeia de polímeros, por meio de ligações covalentes, iônicas ou hidrogênio (ORYAN *et al.*, 2018; ALVES *et al.*, 2019). Apesar do uso de ambas reticulações (química ou natural), o agente reticulante natural apresenta maior vantagem, devido ser biocompatível e apresentar baixo efeito citotóxico na aplicabilidade clínica (CHOI; KIM; MIN, 2016; ALVES *et al.*, 2019).

### 3.4.2 Polifenóis isolados do suco da romã (Punica granatum L.)

Os polifenóis ou compostos fenólicos de origem natural são produtos secundários do metabolismo de vegetais e têm como função a proteção da planta contra condições adversas e contribuem para as características de adstringência, cor e sabor e sua estabilidade oxidativa (NACZK; SHAHIDI, 2004; MARTÍN *et al.*, 2017). Em nossas dietas, os polifenóis são os antioxidantes mais abundantes presentes nos vegetais, cereais, chás, vinhos e frutas como laranja, tangerina, cereja, uva, mirtilo e romã (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007; FREITAS, 2019).

A romã pertence à família Punicaceae, sendo cultivada em região subtropical e tropical, a fruta tem sido utilizada em muitos países e culturas de todo o mundo (*PUTNIK et al.*, 2018; BASSIRI-JAHROMI; DOOSTKAM, 2019). O fruto da romã contém muitos arilos (polpa vermelha e sementes) separados por uma membrana chamada de pericarpo. A romã (casca, semente e suco) possui uma fonte valiosa de polifenóis, como punicalagina, elagitaninos, taninos, flavonoides, antocianinas e entre outros (AMBIGAIPALAN; CAMARGO; SHAHIDI, 2016; BASSIRI-JAHROMI; DOOSTKAM, 2019).

Quimicamente, os polifenóis apresentam vários grupos hidroxilas nos anéis aromáticos. Assim, os polifenóis são classificados de acordo com o número de anéis fenólicos e os elementos estruturais para ligação nos anéis. Dessa forma, os principais grupos de polifenóis são os ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas (MARTÍN *et al.*, 2017). A Figura 4 descreve o fluxograma das classes e subclasses dos polifenóis.



Figura 4 - Fluxograma da classificação dos polifenóis baseados no tipo dos fitoquímicos fenólicos

Fonte: Elaboração própria.

Antocianinas pertencem à classe dos flavonoides, sendo o maior grupo de pigmentos solúveis em água (SHAIDI; NACZK, 2005). Basicamente, a estrutura química das antocianinas é formada por ligações de anéis de benzeno (C6-C3-C6) que diferem pelo número, posição e grau de hidroxilação e metoxilação dos anéis. Na literatura, existem seis principais antocianinas descritas, sendo cianidina, delfinidina, malvidina, peonidina, pelargonidina e petunidina (DELGADO-VARGAS; JIMENEZ; PAREDES-LOPEZ, 2010).

As principais propriedades medicinais descritas são atividade antioxidante, cicatrização de feridas, antidiabético, antitumoral, anti-inflamatório e antimicrobiano (NASCIMENTO JÚNIOR et al., 2016; PUTNIK *et al.*, 2018). Nas doenças cardiovasculares, a romã é considerada uma fruta saudável, pois possui agentes antioxidantes que protegem a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a lipoproteína de alta densidade (HDL) da oxidação, atenuando o desenvolvimento de aterosclerose e diminuindo a pressão arterial (AVIRAM; ROSENBLAT, 2013; KHOO *et al.*, 2017).

Além disso, as antocianinas apresentam interesse para atuar no processo de reticulação, devido à sua composição. Especificamente, no terminal hidroxila (-OH), podendo ser atrativo para atuar como agente reticulante natural no processo de reticulação química. Porém, na literatura, não há estudos que relacionem essa ação de reticulante das antocianinas com a MEC (p.ex. colágeno) ou dispositivos biológicos, contudo, existem algumas características estruturais que evidenciam esse potencial.

#### 3.4.3 Difenil fosforil azida

O processo de reticulação química é um método eficaz para diminuir a taxa de biodegradação e otimizar as propriedades mecânicas dos biomateriais baseado em COL. Como descrito na literatura, o glutaraldeído é o agente reticulante químico mais usado na reticulação do COL, contudo, sua citotoxicidade é considerada como desvantagem, limitando o crescimento dos fibroblastos e diminuindo o benefício do uso do COL (PETITE *et al.*, 1994; USHA; SREERAM; MANDAL, 2013).

Por outro lado, o difenil fosforil azida (DPPA) demonstrou resultados menos tóxico quando comparado com o glutaraldeído (USHA; SREERAM; MANDAL, 2013). A organização do COL na presença de DPPA apresenta maior estabilidade, devido no processo de reticulação envolver a transformação de grupos carboxila livres em grupos acil-azida, que reagem com grupos amino livres nas cadeias adjacentes (ROCHE *et al.*, 2000; USHA; SREERAM; MANDAL, 2013).

Desta forma, o efeito promovido por DPPA apresenta vantagem no processo de reticulação com COL em matrizes tridimensionais porosas, para aplicação na engenharia de tecido, conferindo uma excelente biocompatibilidade, aumento na propriedade mecânica, estabilidade e diminuição da biodegradabilidade (MARINUCCI *et al.*, 2003; SALLENT; CAPELLA-MONSONÍS; ZEUGOLIS, 2019).

# 3.4.4 Ácido hialurônico

O ácido hialurônico (AH) é um glicosaminoglicano que consiste em um polissacarídeo linear presente na MEC do corpo humano, possuindo importância e atraindo interesse de uso em diversas áreas, como na medicina regenerativa na composição de *scaffold*, com propriedades físicas e bioquímicas. Muitos processos biológicos mediados por *scaffold* compostos por AH são primordiais no processo de cicatrização de feridas (COLLINS; BIRKINSHAW, 2013; PERNG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2019).

A principal função descrita para o AH no organismo, está relacionada pela ligação de água e lubrificação nos tecidos móveis (articulações e músculos). A consistência e compatibilidade biológica do AH, permite que seja aplicado como hidratante. Biologicamente o AH apresenta funções na manutenção da viscoelasticidade dos tecidos das articulações, como fluído sinovial e fluído dos olhos, controle da hidratação dos tecidos, transporte de água, organização supramolecular dos proteoglicanos da MEC e receptor na divisão celular, migração e processos inflamatórios. Desta forma, as propriedades viscoelástica, biocompatível e não imunogênica tornam o AH, um biopolímero com potencial de escolha para compor os *scaffolds* (GOA; BENFIELD, 1994; NECAS *et al.*, 2008).

Como descrito por Collins; Birkinshaw, (2013), as principais vantagens do uso de AH na engenharia de tecidos são (i) biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioreabsorbilidade; (ii) principal componente intracelular dos tecidos conjuntivos, onde desempenha um papel na diferenciação e crescimento celular; (iii) em sua composição química apresenta grupos funcionais como ácidos carboxílicos e álcoois, que podem atuar no processo de reticulação; (iv) potencial de proporcionar uma cicatrização mais rápida (angiogênese); e (v) possui capacidade de manter o microambiente hidratado, propiciando infiltração celular.

## 3.4.5 Fibroína da seda

As proteínas da seda estão presentes nas glândulas de artrópodes produtores da seda, como o bichos-da-seda, aranhas, escorpiões, ácaros e abelhas durante sua metamorfose. A seda do bicho-da-seda tem sido usada amplamente na indústria têxtil. Nos biomateriais obtidos do casulo do bicho-da-seda, se destaca os produzidos pela *Bombyx mori* membro da família Bombycidae, também conhecido como seda de amora (KUNDU *et al.*, 2013).

Os casulos do bicho-da-seda apresentam dois componentes principais, como a fibroína e sericina. A fibroína é uma proteína estrutural da seda e a sericina é a proteína do tipo cola solúvel em água, que promove a ligação com as fibras de fibroína. Por isso, a fibroína é denominada como proteína fibrosa insolúvel composta por aminoácidos, glicina, alanina e serina que formam folhas antiparalelas nas fibras, levando a estabilidade e característica mecânica. Comercialmente, além da produção têxtil a fibroína da seda tem sido usada como suturas biomédicas (KIM *et al.*, 2005; NAZAROV; JIN; KAPLAN, 2008).

Para aplicação da fibroína da seda (FS), essa proteína fibrosa insolúvel passa por um processo de extração denominado como desgomagem, que permite a remoção da sericina por dissolução usando solução de carbonato de sódio, resultando na solução de FS. Após o completo processo de extração a FS, obtém a fibroína com conformação de folhas- $\beta$  (menos ordenadas) (ALVES; ARANHA; CHAUD, 2018; KOMATSU *et al.*, 2017).

Alves; Aranha; Chaud, (2018) descreveram um estudo que comparam as propriedades estruturais e térmicas de filmes compostos por FS, obtidos por diferentes tratamentos como (i) recozimento; (ii) ultracongelamento seguido por liofilização; e (iii) não processado. Nesse estudo foi observado que o uso de tratamento (i ou ii) influenciou na mudança de conformação estrutural da FS, induzindo na mudança de folhas- $\beta$  para  $\alpha$ -helicoidal e bobina aleatória em folhas- $\beta$  altamente estável. Essa modificação de conformação promove melhora na propriedade mecânica e torna a FS mais biocompatível, biodegradável, e com a presença de grupamentos químicos com acesso fácil para modificações (reticulação) (KIM *et al.*, 2005; KUNDU *et al.*, 2013).

#### 3.4.6 Copolímero anfifílico

O poloxamer 407® (P407) é considerado um copolímero anfifílico não iônico, que consiste em unidades de óxido de etileno (PEO) e óxido de polipropileno (PPO), possuindo capacidade única de termossensibilidade, que permite formar um sistema com propriedade termorresponsiva. O P407 favorece a adesão celular inicial e contribui para o melhor nível de angiogênese, possuindo característica não-tóxico, biocompatível e biodegradável (DUMORTIER *et al.*, 2006; DINIZ *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016).

## 3.5 Cristal líquido liotrópico

Os materiais biomiméticos são produtos racionalmente projetados, que exploram interações específicas, ajustável, reversível e biodegradável, oferendo vantagens em relação aos materiais convencionais não modificados. Esses sistemas biomiméticos podem ser usados como veículo de liberação de fármacos ou liberação alvo-específico. Quando projetados podem detectar e responder estímulos fisiológicos, ou mimetizar aspectos estruturais e funcionais de sinalização biológica (WEBBER *et al.*, 2015). Esses biomateriais são fabricados para mimetizar a conformação espacial e temporal nativa ou substituir fatores bioquímicos e fisiológicos, com finalidade de melhorar ou recuperar as funções biológicas (VAKILI *et al.*, 2016).

Nesse contexto, o cristal líquido é considerado uma nanoestrutura biomimética, que foi descoberta pelo britânico Friedrich Reinitzer em 1888. Essa descoberta foi guiada pela observação de dois pontos de fusão, distintos no benzoato de colesterila. Com o aumento da temperatura na amostra sólida, houve inicialmente uma transição para um líquido turvo (145,5°C), e em um aumento de temperatura continuada, resultou em um líquido transparente (178,5°C) (BECHTOLD, 2005; LANCELOT; SIERRA; SERRANO, 2014).

De acordo com Mitov, (2014) esse fenômeno foi surpreendente, pois na época os pesquisadores tinham como concepção, que um material com característica cristalina deveria perder cor e solidez em uma única temperatura. Assim, Friedrich Reinitzer e Otto Lehmann trabalharam juntos na caracterização e definição desses novos modelos de cristais, devido Otto Lehmann ser um cristalógrafo experiente, mas também por ter fabricado um arsenal de microscópios.

Em 1889, Otto Lehmann observou que algumas substâncias fundiam passando por estado intermediário durante a transição térmica de sólido para cristalino, o qual denominou como cristal líquido birrefringente. A birrefringência ou dupla refração é uma propriedade apresentada por materiais cristalinos, no qual ocasiona um fenômeno de propagação de luz no interior do material, exibindo anisotropia com direção óptica. No entanto, Lehmann acreditava que a única diferença entre cristal líquido e cristal sólido era seu grau de fluidez, porém, a diferença também estava no seu grau de organização e ordenamento molecular (CARLIN *et al.*, 2005; GARIDEL *et al.*, 2015; RAJAK; NATH; BHUYAN, 2018). A Figura 5 mostra uma representação esquemática do comportamento molecular e das transições de fases entre o sólido cristalino, cristal líquido e líquido isotrópico.

Figura 5 - Representação esquemática do comportamento molecular e das transições de fases entre o sólido cristalino, cristal líquido e líquido isotrópico



Fonte: Adaptação de Bechtold, (2005).

Portanto, os termos ordenado e desordenados são referências ao estado de ordem do material cristalino. A terminologia "líquido" se refere a falta de ordem posicional de longo alcance, e como consequência uma falta de estrutura dos lipídeos dentro do plano de bicamada, conferindo uma velocidade elevada para difusão lateral. Diferente do termo "sólido" que está relacionado com ordem posicional dentro da membrana, mas com uma difusão lateral lenta (HIRST *et al.*, 2011; LINGWOOD; SIMONS, 2010). O comportamento e conformação estrutural do cristal líquido sofre influência dos estímulos endógenos e exógenos, como temperatura, intensidade de luz, pH e energia livre (NAZARUK *et al.*, 2014).

De acordo com Guo et al., (2010) e Fonseca-santos et al., (2016), os cristais líquidos são compostos por moléculas anfifílicas e/ou lipídicas, que podem se auto-organizar de modo espontânea em estruturas tridimensionais capazes de incorporar substâncias bioativas. Os parâmetros físico-químicos são responsáveis pela transição de fase, por isso, os cristais líquidos foram classificados como cristal líquido termotrópico (CLT), com cristalinidade induzida pela temperatura e cristal líquido liotrópico (CLL), com cristalinidade induzida principalmente por solventes (LUGGER *et al.*, 2018).

O CLT consiste de moléculas únicas ou mistura de moléculas, apresentando um grau de ordenamento em função da temperatura, que resultam em diferentes estruturas morfológicas como esmética (eixos longos com moléculas paralelas e perpendiculares), nemática (as moléculas não possuem um ordenamento como a esmética, mas mantém ordenamento perpendicular) e colestérica (combinação entre esmética e nemática) (KAWAMOTO, 2002; CHAUDHARY; KANNOJIA; MISHRA, 2017). Os CLT são os cristais mais comumente descritos nas aplicações tecnológicas de dispositivos em display (LCD) e sensores (BISOYI; KUMAR, 2011).
O CLL consiste por moléculas anfifílicas associadas com solvente, sendo geralmente a água ultrapura, e em decorrência da variação de temperatura e concentração de moléculas anfifílicas e solventes, podem originar três diferentes ordenamentos estruturais de CLL. Esses ordenamentos foram classificados como lamelar (L $\alpha$ ), hexagonal (H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>) e cúbico (V<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>), podendo esses dois últimos apresentarem conformações reversas. Na fase lamelar, o ordenamento das moléculas formam estruturas em bicamadas superpostas, enquanto na fase hexagonal esse ordenamento se apresenta em cilindro, e na fase cúbica exibe uma estrutura tridimensional altamente viscosa (SINGHVI; BANERJEE; KHOSA, 2018; SOUZA *et al.*, 2017). A Figura 6 mostra uma representação esquemática dos diferentes ordenamentos estruturais do CLL.

**Figura 6** - Representação esquemática dos três diferentes ordenamentos estruturais do cristal líquido liotrópico classificados como (A) lamelar, (B) hexagonal e (C) cubico.



Fonte: Adaptado de Fonseca-Santos, (2015).

De acordo com Souza et al., (2017), os CLL são considerados nanoestruturas únicas, com vantagens nas propriedades físicas, químicas e biológicas podendo ser explorado na aplicação clínica, atuando como sistema de liberação de fármacos e dispositivos biomédicos. Essa nanoestrutura tem apresentado um potencial promissor devido sua característica biomimética, capacidade de proteger fármacos e substâncias bioativas de sofrerem degradação física e química, além de fornecer uma matriz para liberação controlada e sustentada de fármacos (RAJABALAYA *et al.*, 2017).

Além da aplicação de CLL como carreador de fármacos, uma nova geração desse sistema tem apresentado destaque. O CLL não-lamelar (hexagonal e cúbico) são considerados biomateriais semicondutores, estimulantes e promissores que podem ser úteis e viáveis na funcionalização de dispositivos biomiméticos, devido serem materiais nanocompartimentados que podem se auto-organizar e criar poros ordenados em escala nanométrica, controlando a organização estrutural e promovendo sinais para estímulo celular (SANTIAGO-MARTORAL; FIGUEROA; NICOLAU, 2020).

Até o momento, apenas o estudo publicado por Santiago-Martoral; Figueroa; Nicolau, (2020) descreve sobre a associação de sistemas complexos e/ou sobrepostos usando CLL para

remediação de água. Nenhum outro estudo foi encontrado para aplicação na área da medicina regenerativa.

#### 3.6 Componentes aplicados na formulação de cristal líquido liotrópico

#### 3.6.1 Monoleína

A monoleína (MO) é um monoglicerídeo insaturado de cadeia longa, composto principalmente por glicerídeos do ácido oleico e ácidos graxos. Esse biomaterial apresenta característica de auto-organização espontânea em meio aquoso, podendo formar diversas estruturas líquido cristalinas, com matrizes ordenadas dependendo da concentração de solvente e variação de temperatura. Os monoglicerídeos possuem características anfifílicas, com capacidade de intumescimento, sendo considerados um material auto-organizado, biocompatível, biodegradável e atóxico (LOPES *et al.*, 2006; BORGHETI-CARDOSO *et al.*, 2015).

A MO pode ser obtida por diferentes reações como esterificação de ácidos graxos (ácido oleico e glicerol) ou por transesterificação do refinamento dos óleos vegetais de canola e girassol. A MO-18-92 (Myverol 18-92) é derivada do óleo de girassol composta por 96% de monoglicerídeo total e 0,3% de glicerol livre (GANEM-QUINTANAR *et al.*, 2000), e a MO-18-99 (Myverol 18-99) é de alta qualidade com no mínimo 90% de monoésteres derivados do óleo de canola (D'ANTONA *et al.*, 2000). Ambas as monoleínas são compostas por mais de 80% de monoglicerídeos insaturados e mais de 95% de monoglicerídeos (CHANG; BODMEIER, 1997).

Ganem-Quintanar *et al.*, (2000) realizaram uma revisão abordando as principais aplicações farmacêuticas de MO. Portanto, de acordo com esse estudo as principais aplicações descritas foram emulsificante, solubilizante, potencial para aumento de absorção de fármacos, e pode também ser aplicada como sistema nanoestruturado para liberação de fármacos nas vias de administração oral, parenteral, periodontal e transdérmico.

### 3.6.2 Copolímero anfifílico

O P407 como descrito anteriormente é um copolímero anfifílico não iônico, e a sua aplicação em sistemas precursores de CLL tem como função promover uma interface estabilizadora entre as fases aquosa e oleosa, podendo influenciar na formação dos canais de água. Alguns estudos associaram monoleína (material auto-organizado) e P407, com objetivo de obter uma nanopartícula mais estável, mediada pelo efeito da hidrotropia. Esse efeito é

obtido por substâncias surfactantes (hidrótropos), que promovem o aumento da solubilidade e auxiliam na formação dos canais de água nos sistemas baseados em CLL (MADHESWARAN *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2020).

### 3.7 Conclusões

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte, e em alguns países é responsável por cerca de uma a cada três mortes. Após lesões no tecido cardíaco pós-IM ocorre uma substituição do tecido contrátil por cicatriz fibrótica, não contribuindo para função de bombeamento cardíaco e prejudicando a qualidade e tempo de vida, causando insuficiência cardíaca.

A engenharia de tecido é uma área interdisciplinar que consiste na projeção de dispositivos biológicos. Esse dispositivo é chamado de *scaffold* e identificado como matriz tridimensional porosa, capaz de mimetizar a MEC e estimular respostas celulares específicas em nível celular, tendo como função ser suporte temporário para que as células do tecido nativo viável possa aderir, migrar, proliferar, diferenciar e formar um novo tecido.

O *scaffold* pode ser utilizado como terapia acelular para recuperação tecidual e funcional cardíaca. A sua composição química, propriedades mecânicas e arquitetura tridimensional, desempenham características primordiais para interação entre célula e microambiente. Esse microambiente deve ser projetado criteriosamente para poder suportar a diferenciação e a organização celular.

O CLL é considerado um sistema biomimético, com mesofase cristalina de transição entre sólido cristalino e líquido isotrópico. Diante disso, apresentam características física de sólido (rigidez) e líquido (fluidez), sendo classificado pelo grau de ordenamento, arranjo e alinhamento molecular. Nos estudos recentes, os CLL não-lamelares (hexagonal ou cúbico) vem se destacando devido sua característica semicondutora e estimulante, conferindo autoorganização espontânea e permitindo a formação de poros ordenados em escala nanométrica, controlando a organização estrutural e promovendo sinais para estímulo celular.

# CAPÍTULO II

4 OBTENÇÃO DE CRISTAL LÍQUIDO LIOTRÓPICO BASEADO EM DIAGRAMA TERNÁRIO DE FASES: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, ESTUDO DE ESTABILIDADE TERMODINÂMICA E AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

# 4.1 Resumo gráfico



Fonte: Elaboração própria.

#### 4.2 Introdução

O CLL é um sistema auto-organizado, que apresenta mesofase cristalina com transição entre sólido e líquido. Por isso o CLL, apresenta característica física de sólido (rigidez) e líquido (fluidez), sendo classificado pelo grau de ordenamento, arranjo e alinhamento molecular. Devido seus diferentes arranjos, o CLL tem capacidade de se estruturar em três diferentes morfologias, sendo classificado como lamelar (ou cruz de malta), hexagonal ou cúbica (GARIDEL *et al.*, 2015; RAJAK; NATH; BHUYAN, 2018).

Na literatura as principais propriedades e aplicações de CLL são carreadores de fármacos, atuando como sistema de liberação controlada, viscoelasticidade e características sinalizadora, estimulante e condutora de estímulos elétricos. Essa propriedade de condução e propagação de estímulos elétricos faz do CLL um biomaterial de interesse, para associação com *scaffold* acelular para aplicação no tecido cardíaco (MERZLYAK *et al.*, 2009; SANTIAGO-MARTORAL; FIGUEROA; NICOLAU, 2020).

Nesse estudo o objetivo foi desenvolver sistemas precursores de CLL baseado em diagrama ternário de fases. Os CLL foram caracterizados por avaliação morfológica usando microscopia de luz polarizada, estudo de estabilidade termodinâmica avaliados pelo potencial zeta, diâmetro de partícula e índice de polidispersidade e avaliação físico-química por Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e calorimetria exploratória diferencial.

#### 4.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental desse estudo foi realizado em escala laboratorial, no Laboratório de biomateriais e nanotecnologia da Universidade de Sorocaba (LaBNUS). O desenvolvimento do estudo está apresentado esquematicamente na Figura 7.

Figura 7 - Fluxograma esquemático da obtenção, caracterização e seleção das formulações de cristal líquido liotrópico



Nota: FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier; DSC - Calorimetria exploratória diferencial. Fonte: Elaboração própria.

# 5 MATERIAL E MÉTODOS

#### 5.1 Material

Monoleína 18-92 (Myverol 18-92K. Kerry, Lote: 2017539, Wisconsin, EUA), monoleína 18-99 (Myverol 18-99K. Kerry, Lote: 1806600148, Wisconsin, EUA), Poloxamer  $407^{\text{(B)}}$  (Sigma-Aldrich, Lote: BCBQ6661V, Saint Louis, USA), água ultrapura (18,2 M $\Omega$ .cm<sup>-1</sup>) e os demais reagentes foram de grau analítico.

#### 5.2 Métodos

# 5.2.1 Preparação das formulações de cristal líquido liotrópico baseado em diagrama ternário de fases como superfície de resposta

As formulações de CLL foram preparadas com monoleína 18-92 (MO-18-92) ou monoleína 18-99 (MO-18-99) como fase oleosa, poloxamer 407<sup>®</sup> (P407) como hidrótropo e água ultrapura. Os diagramas ternários de fases foram usados como superfície de resposta para seleção das formulações precursoras de CLL, sendo representados por um triângulo equilátero, onde cada aresta corresponde ao percentual de cada fase (oleosa, aquosa e

hidrótropo). A fase oleosa foi representada pela aresta superior esquerda, fase aquosa pela aresta superior direita e o hidrótropo pela base do triângulo. A leitura das combinações, referente a composição de cada formulação deve ser realizada no sentido horário. Assim, as proporções (m/m) das formulações e construção do diagrama ternário de fases são apresentadas na Tabela 1.

Formulações	Composição			
Formulações	Fase oleosa (g)	Fase aquosa (g)	Hidrótropo (g)	
F1	1	8	1	
F2	2	7	1	
F3	1	7	2	
F4	3	6	1	
F5	2	6	2	
F6	1	6	3	
F7	4	5	1	
F8	3	5	2	
F9	2	5	3	
F10	1	5	4	
F11	5	4	1	
F12	4	4	2	
F13	3	4	3	
F14	2	4	4	
F15	1	4	5	
F16	6	3	1	
F17	5	3	2	
F18	4	3	3	
F19	3	3	4	
F20	2	3	5	
F21	1	3	6	
F22	7	2	1	
F23	6	2	2	
F24	5	2	3	
F25	4	2	4	
F26	3	2	5	
F27	2	2	6	
F28	1	2	7	
F29	8	1	1	
F30	7	1	2	
F31	6	1	3	
F32	5	1	4	
F33	4	1	5	
F34	3	1	6	
F35	2	1	7	
F36	1	1	8	

 Tabela 1 - Proporção das formulações obtidas para projeção das formulações de cristal líquido liotrópico para construção do diagrama ternário de fases

Fonte: Elaboração própria.

Uma representação esquemática do processo de preparação das formulações é apresentada na Figura 8. Os diagramas ternários de fases foram obtidos por titulação da fase aquosa, adicionada à mistura entre Monoleína:P407 (m/m). As formulações foram preparadas em aquecimento à 50 °C, sendo mantidas sob agitação em banho de ultrassom, com frequência de 40 kHz (Unique, USC-3300. Indaiatuba, Brasil) durante 5 minutos. Após obtenção das formulações de CLL, os sistemas permaneceram sob agitação até resfriamento (25 °C).





Nota: CLL - Cristal líquido liotrópico. Fonte: Elaboração própria.

Neste estudo foram obtidos dois diagramas ternários de fases, o diagrama ternário de fases 1 (DT1) foi obtido com a MO-18-92, e o diagrama ternário de fases 2 (DT2) com a MO-18-99, como fase oleosa. Em cada diagrama foram obtidas 36 formulações (F1-F36), assim os diagramas DT1 e DT2 totalizaram 72 formulações.

#### 5.2.2 Seleção das formulações de cristal líquido liotrópico

As formulações de CLL foram selecionadas pela avaliação macroscópica e avaliação microscópica com luz polarizada. A avaliação macroscópica foi realizada como descrito por Calixto et al. (2016) e Souza *et al.*, (2020), na qual classificaram as formulações como sistemas viscosos com aspecto translúcido (VT) ou opaco (VO), líquidos com aspecto translúcido (LT) ou opaco (LO), ou instável com separação de fases (SF). Essas avaliações foram usadas para delimitar as regiões nos diagramas ternários de fases (DT1 e DT2).

A avaliação microscópica com luz polarizada foi usada para avaliar ausência ou presença de anisotropia e formação de lamelas e/ou nanopartículas de CLL, após 24 horas sendo o tempo necessário para permitir a estabilização das formulações. Para microscopia, as amostras foram depositadas, cuidadosamente, em lâmina de vidro formando um filme. A

análise foi realizada em microscópio com modo polarizado (Nikon, Eclipse E800. Tóquio, Japão), contraste em modo ampliado, resolução em alta exposição para ajuste de nitidez e com magnificação de 100x. As imagens micrográficas foram capturadas com câmera (Nikon, DS-r 1. Tóquio, Japão), com auxílio do *Software NIS-Elements*.

#### 5.2.3 Potencial zeta, diâmetro de partícula e índice de polidispersidade

Para avaliação de potencial zeta, diâmetro de partícula e índice de polidispersidade (BrookHaven - NanoBrook-90 Plus, Nova Iorque, Estados Unidos) o equipamento foi ajustado em 635 nm e com ângulo fixo de 90°. No ensaio, as amostras (10 mg) foram diluídas em água ultrapura (1:1.000) e a leitura foi realizada, em triplicata, por células eletroforética à 25 °C. As formulações foram acompanhadas ao longo de 30 dias. Os resultados de estabilidade termodinâmica de potencial zeta foram expressos em milivolt (mV) e para diâmetro de partículas em nanômetro (nm).

#### 5.2.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização dos grupamentos químicos específicos dos componentes das formulações (MO-18-92, MO-18-99 e P407) e as formulações de CLL foram determinadas por FTIR (Shimadzu, IRAffinity-1S, Kyoto, Japão) pela técnica de reflectância atenuada (ATR). Para análise, os espectros foram obtidos em modo de transmitância, com número de ondas na faixa de 4.000 a 500 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e 128 *scans*. Os espectros foram normalizados e as bandas de vibrações foram associadas aos principais grupamentos químicos de cada amostra. Os resultados foram adquiridos usando o *Software Labsolutions*.

#### 5.2.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização termoanalítica dos componentes das formulações (MO-18-92, MO-18-99 e P407) e as formulações de CLL foram realizadas usando DSC (Thermal Analyzer TA-60WS, DSC-60, Shimadzu, Kyoto, Japão). Para análise, as amostras (2 mg) foram acondicionadas em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados, submetidos em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup>, com faixa de aquecimento de 25-300 °C e taxa de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>. Os resultados foram adquiridos usando o *Software* TA-60WS.

#### 5.2.6 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey

para comparação entre as médias, com intervalo de confiança de 95%. O valor de p<0,05 foi considerado significativo.

#### 6 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 6.1 Obtenção e seleção das formulações de cristal líquido liotrópico

As formulações de CLL foram obtidas usando dois tipos de fase oleosa, sendo MO-18-92 e MO-18-99. A monoleína é um monoglicerídeo insaturado de cadeia longa, composto por glicerídeos do ácido oleico e ácidos graxos, onde formam diversas fases de estrutura líquido cristalina, que podem se auto-organizar em matrizes ordenadas dependendo da concentração de solvente e temperatura. Os monoglicerídeos possuem características anfifílicas, com capacidade de intumescimento e auto-organização, biocompatível, biodegradável e atóxico (LOPES et al., 2006; BORGHETI-CARDOSO *et al.*, 2015).

A monoleína pode ser obtida por diferentes reações como esterificação de ácidos graxos ou transesterificação do refinamento dos óleos vegetais. Ambas as monoleínas são compostas por mais de 80% de monoglicerídeos (CHANG; BODMEIER, 1997). Além da monoleína, para compor as formulações de CLL foi usado o P407, um copolímero tribloco anfifílico sintético, não-iônico e atóxico. Amplamente usado para estabilizar as nanoestruturas de CLL (TALASAZ *et al.*, 2008; ABDELAZIZ *et al.*, 2019).

Como descrito por Madheswaran *et al.*, (2019) e Souza *et al.*, (2020) existem estudos que relatam a obtenção de nanoestruturas de CLL compostas por monoleína (material autoorganizado) associada ao P407, para promover o efeito de hidrotropia. Os hidrótropos são substâncias surfactantes, que promovem efeito de hidrotropia. Essas substâncias permitem causar aumento da solubilidade em meio aquoso, auxiliando na formação dos canais de água em sistemas precursores de CLL (GUO *et al.*, 2010).

Para critério de seleção, as formulações de CLL (F1-F36) obtidas na construção dos diagramas ternários de fases (DT1 e DT2) foram avaliadas macroscopicamente quanto aspecto físico (separação de fases e transparência), seguido por avaliação microscópica com luz polarizada para confirmar a presença de lamelas e/ou CLL. Os resultados dos diagramas ternários de fases (DT1 e DT2) obtidos como superfície de resposta são apresentados na Figura 9, respectivamente, para formulações compostas por MO-18-92:água ultrapura:P407 (DT1) e MO-18-99:água ultrapura:P407 (DT2).

**Figura 9 -** Diagrama ternário de fases 1 (A) e Diagrama ternário de fases 2 (B) das formulações de cristal líquido liotrópico (F1-F36) obtidas com monoleína 18-92, água ultrapura e poloxamer 407<sup>®</sup> (DT1) e monoleína 18-99, água ultrapura e poloxamer 407<sup>®</sup> (DT2)



Nota: P407 - Poloxamer 407<sup>®</sup>. Sistemas viscosos translúcidos (VT), sistemas viscosos opacos (VO), sistemas líquidos translúcidos (LT), sistemas líquidos opacos (LO) e sistemas instáveis com separação de fases (SF). Fonte: Elaboração própria.

Na Fig. 9-A, as formulações F1, F5, F6, F8, F10, F13, F15, F20 e F21 foram classificadas como VT, como VO foram classificadas F2-F4, F7, F9, F14, F24, F27, F28 e F30-F34. As formulações F11, F12, F16-F19, F22, F23, F26 e F29 foram classificadas como LT, como LO foi classificada apenas a F25 e as formulações F35 e F36 como SF. As formulações classificadas como VT variaram entre 10-30% de monoleína, 10-60% de hidrótropo e 30-80% de fase aquosa, em VO as formulações variaram entre 10-70% para monoleína, hidrótropo e fase aquosa. Nas formulações classificadas como LT variaram entre 30-80% de monoleína, 10-50% de hidrótropo e 10-40% de fase aquosa. A formulaçõe classificada por LO foi composta por 40% de monoleína e hidrótropo e 20% de fase aquosa. As formulações consideradas como instáveis variaram entre 10-20% de monoleína, 70-80% de hidrótropo e 10% de fase aquosa.

Na Fig. 9-B, as formulações F1, F2, F4, F8, F10, F11, F13, F16, F19 e F21 foram classificadas como VT, como VO foram classificadas as F3, F5-F7, F9, F14, F15, F20, F26-F28 e F31-F36. As formulações F12, F17, F18, F23-F25, F29 e F30 foram classificadas como LT e como LO foi classificada apenas a formulação F22. Não foram observadas formulações instáveis (SF) para os sistemas formados com MO-18-99. As formulações classificadas como VT variaram entre 10-60% de monoleína e hidrótropo e 30-80% de fase aquosa, para VO as formulações variaram entre 10-60% para monoleína, em hidrótropo de 10-80% e 10-70% de fase aquosa. Nas formulações classificadas como LT variaram entre 40-80% de monoleína, 10-40% para hidrótropo e fase aquosa. A formulação classificada por LO foi composta por 70% de monoleína, 10% de hidrótropo e 20% de fase aquosa.

Quando comparadas as formulações de CLL (F1-F36) obtidas, em ambos os diagramas (DT1 e DT2), as formulações F1, F8, F10, F13 e F1 foram consideradas sistemas VT, para VO foram as F3, F7, F9, F14, F27, F28 e F31-34 e as formulações F12, F17, F18, F23 e F29 foram consideradas LT. As demais formulações que não foram semelhantes, em ambos os diagramas, corroboraram com a influência da diferença do tipo de monoleína usada em cada diagrama. A classificação como opaca ou translúcida está relacionada, com a diferença no índice de refração da fase dispersa (interna) e contínua (externa), e ocorre quando o tamanho da gota e o volume da fração dispersa são moderados (ALAM; ARAMAKI, 2014).

Alguns estudos relatam a presença de nanopartículas de CLL em sistemas classificados como líquido ou viscoso translúcido (CARVALHO *et al.*, 2013; CALIXTO *et al.*, 2016). Desta forma, todas as formulações que foram consideradas líquida ou viscosa translúcida foram selecionadas para avaliação microscópica com luz polarizada. Assim, nas Tabelas 2 e 3 estão apresentados os resultados de anisotropia e presença de lamelas e/ou CLL, respectivamente, para as formulações selecionadas dos diagramas ternários de fases (DT1 e DT2).

Formulaçãos	Parâmetros avaliados			
rormulações	Anisotropia	Presença de lamelas e/ou CLL		
DT1-F1	Não	Não		
DT1-F5	Não	Não		
DT1-F6	Sim	Sim		
DT1-F8	Não	Não		
DT1-F10	Não	Não		
DT1-F11	Não	Não		
DT1-F12	Não	Não		
DT1-F13	Não	Não		
DT1-F15	Sim	Sim		
DT1-F16	Não	Não		
DT1-F17	Não	Não		
DT1-F18	Não	Não		
DT1-F19	Não	Não		
DT1-F20	Sim	Sim		
DT1-F21	Sim	Sim		
DT1-F22	Não	Não		
DT1-F23	Não	Não		
DT1-F26	Sim	Não		
DT1-F29	Não	Não		

 Tabela 2 - Resultados de anisotropia e presença de lamelas e/ou cristal líquido liotrópico nas formulações do diagrama ternário de fases 1 avaliados por microscopia com luz polarizada

Nota: DT1 - Diagrama ternário de fases 1, obtido com monoleína 18-92. Formulações de CLL compostas por Monoleína:Água ultrapura:Poloxamer 407. Fonte: Elaboração própria.

Conforme os dados apresentados na Tab. 2, das vinte formulações selecionadas para análise microscópica com luz polarizada, apenas as formulações DT1-F6, DT1-F15, DT1-F20 e DT1-21 apresentaram resultados positivos para parâmetros avaliados de anisotropia e presença de lamelas e/ou CLL, e por isso, foram selecionadas para prosseguirem no estudo e serem caracterizadas por potencial zeta, diâmetro de partícula e índice de polidispersidade.

Formulaçãos	Parâmetros avaliados			
ronnunações	Anisotropia	Presença de lamelas e/ou CLL		
DT2-F1	Não	Não		
DT2-F2	Não	Não		
DT2-F4	Não	Não		
DT2-F8	Não	Não		
DT2-F10	Não	Não		
DT2-F11	Não	Não		
DT2-F12	Não	Não		
DT2-F13	Não	Não		
DT2-F16	Não	Não		
DT2-F17	Não	Não		
DT2-F18	Não	Não		
DT2-F19	Não	Não		
DT2-F21	Sim	Sim		
DT2-F23	Não	Não		
DT2-F24	Não	Não		
DT2-F25	Sim	Não		
DT2-F29	Não	Não		
DT2-F30	Não	Não		

**Tabela 3** - Resultados de anisotropia e presença de lamelas e/ou cristal líquido liotrópico nas formulações do diagrama ternário de fases 2 avaliados por microscopia com luz polarizada

Nota: DT2 - Diagrama ternário de fases 2, obtido com monoleína 18-99. Formulações de CLL compostas por Monoleína:Água ultrapura:Poloxamer 407. Fonte: Elaboração própria.

Conforme os dados apresentados na Tab. 3, das dezoito formulações selecionadas para análise microscópica com luz polarizada, apenas as formulações DT2-F21 apresentou resultados positivos para parâmetros avaliados de anisotropia e presença de lamelas e/ou CLL, e por isso, foi selecionada para prosseguir no estudo e ser caracterizada por potencial zeta, diâmetro de partícula e índice de polidispersidade.

A avaliação de anisotropia e presença de lamelas e/ou nanopartículas de CLL foram analisadas em conjunto, pelo desvio da luz polarizada e birrefringência. A birrefringência óptica é a formação de dupla refração apresentada por materiais cristalinos, o qual está relacionada com a propagação de luz polarizada. As nanopartículas de CLL classificadas como anisotrópicas são birrefringentes, enquanto as nanopartículas de CLL isotrópicas não apresentam birrefringência (CALIXTO et al., 2016; LEE *et al.*, 2016).

Diante disso, os CLL com formato hexagonal e lamelar (cruz de malta) são considerados birrefringentes, devido à anisotropia dos arranjos das moléculas, diferente dos CLL com formato cúbico (isotrópico), que não apresentam birrefringência e necessitam de análises complementares para caracterização estrutural (BECHTOLD, 2005b; PAN et al., 2013).

E em análise correlacionada, os resultados da avaliação macroscópica e microscópica com luz polarizada, apresentaram anisotropia e presença de lamelas e/ou CLL para as formulações classificadas como viscosa translúcida. Os resultados da caracterização morfológica usando microscopia com luz polarizada das formulações selecionadas está apresentada na Figura 10.

Figura 10 - Resultados das imagens micrográficas das formulações de cristal líquido liotrópico por microscopia de luz polarizada após 24 horas



Nota: As imagens micrográficas foram obtidas em campo claro, em duas regiões diferentes para cada amostra com magnificação de 100x. Formulações de CLL (DT1-F6, DT1-F21 e DT2-F21) compostas por Monoleína:Água ultrapura:Poloxamer 407. Fonte: Elaboração própria.

Conforme os resultados observados na Fig. 10, as formulações que foram selecionadas (DT1-F6, DT1-F15, DT1-F20, DT1-F21 e DT2-F21) variaram entre 10-20% de monoleína e 30-60% de hidrótropo e fase oleosa. Essas formulações apresentaram birrefringência, indicando presença de nanoestruturas de CLL anisotrópico semelhante a fase hexagonal (DANTE et al., 2018; SHAN et al., 2019; CAMPOS et al., 2020). Para confirmação desse resultado é necessário realizar um teste complementar, como descrito na literatura, o espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS).

#### 6.2 Potencial zeta, diâmetro de partícula e índice de polidispersidade

Nas Figuras 11-13 são apresentados resultados das medidas de potencial zeta, diâmetro de partículas e índice de polidispersidade das formulações (DT1-F6, DT1-F15, DT1-F20, DT1-F21 e DT2-F21) durante o período de acompanhamento (30 dias).

O potencial zeta foi determinado por eletroforese, no qual se mede a carga elétrica de superfície das partículas, e pode ser utilizado como indicativo de estabilidade termodinâmica dos sistemas dispersos (RIZWAN *et al.*, 2007; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Essa medida é influenciada pela dissociação dos grupos funcionais na camada de superfície das partículas ou da adsorção de cargas iônicas presentes no meio. Em relação a estabilidade físico-química, valores relativamente maiores de potencial zeta tem sido considerado importante para minimizar a tendência de agregação das partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Na Figura 11 são apresentados os resultados de potencial zeta das formulações de CLL. Os valores de potencial zeta foram negativos, devido a característica e composição química das formulações analisadas. As formulações apresentaram valor médio entre (-) 15,8 e (-) 30,0 mV durante período de acompanhamento. Alguns estudos, observados na literatura, consideraram sistemas baseados em CLL estáveis, quando apresentam potencial zeta entre (-) 15 mV e (-) 33 mV (EL-REFAIE *et al.*, 2015; JIN *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2020).

Estatisticamente as formulações foram analisadas intragrupo e entre os grupos, dessa forma, no intragrupo foram analisados as formulações isoladas em função do tempo e entre os grupos foram comparadas todas as formulações em cada tempo isolado (1, 7, 15 e 30). Assim, quando analisado intragrupo as formulações DT1-F6, DT1-F21 e DT2-F21 foram diferentes estatisticamente (p<0,05) e as formulações DT1-F15 e DT1-F20 foram semelhantes (p>0,05). Em análise entre os grupos, as formulações DT1-F6, DT1-F20, DT1-F21 e DT2-F21 foram semelhantes (p>0,05) e a formulações DT1-F15 foi estatisticamente diferente (p<0,05) para todos os tempos analisados.





Nota: (\*) Significa que há diferença estatística para o mesmo tempo de acompanhamento (p<0,05). (\*\*) Significa que não há diferença estatística para o mesmo tempo de acompanhamento (p>0,05) (n = 3). Formulações de CLL (DT1-F6, DT1-F15, DT1-F20, DT1-F21 e DT2-F21) compostas por Monoleína:Água ultrapura:Poloxamer 407. Fonte: Elaboração própria.

O diâmetro de partícula é um indicativo de estabilidade termodinâmica dos sistemas dispersos (RIZWAN et al., 2007; SCHAFFAZICK et al., 2003). Segundo Marcato (2009), o diâmetro de partículas é influenciado pela composição das amostras, método de obtenção e condições de preparação (temperatura e agitação). Os resultados das medidas de diâmetro de partículas das formulações de CLL são apresentados na Figura 12.





Nota: (\*) Significa que há diferença estatística para o mesmo tempo de acompanhamento (p<0,05). (\*\*) Significa que não há diferença estatística para o mesmo tempo de acompanhamento (p>0,05) (n = 3). Formulações de CLL (DT1-F6, DT1-F15, DT1-F20, DT1-F21 e DT2-F21) compostas por Monoleína:Água ultrapura:Poloxamer 407.

Fonte: Elaboração própria.

As formulações apresentaram valor médio entre 37,4 nm e 398,9 nm no período do acompanhamento. De acordo com Avachat; Parpani, (2015); El-Refaie *et al.*, (2015); Souza *et al.*, (2020) as formulações precursoras de CLL apresentam estabilidade termodinâmica com diâmetro de partículas com valor médio entre 99,2 nm e 245 nm, durante período de acompanhamento.

Estatisticamente (Fig. 12) as formulações foram analisadas intragrupo e entre os grupos, ou seja, intragrupo foram analisadas as formulações isoladas em função do tempo e entre os grupos foram comparadas todas as formulações a cada tempo isolado (1, 7, 15 e 30). Assim, quando analisados intragrupo e entre os grupos todas as formulações (DT1-F6, DT1-F15, DT1-F20, DT1-F21 e DT2-F21) foram estatisticamente diferentes (p<0,05).

De acordo com Cho, (2013), uma organização da distribuição do diâmetro de partículas ocorre, quando há uma variação do índice de polidispersidade. Os sistemas homogêneos apresentam índice de polidispersidade inferior a 0,25, e consequentemente, são indicativos de sistemas termodinamicamente mais estáveis. Os resultados do índice de polidispersidade para as formulações de CLL são apresentados na Figura 13. As formulações apresentaram valor médio entre 0,25 e 0,35 durante período de acompanhamento.

Figura 13 - Resultados das medidas do índice de polidispersidade das formulações de cristal líquido liotrópico (DT1-F6, DT1-F15, DT1-F20, DT1-F21 e DT2-F21) durante 30 dias



Nota: (\*) Significa que há diferença estatística para o mesmo tempo de acompanhamento (p<0,05). (\*\*) Significa que não há diferença estatística para o mesmo tempo de acompanhamento (p>0,05) (n = 3). Formulações de CLL (DT1-F6, DT1-F15, DT1-F20, DT1-F21 e DT2-F21) compostas por Monoleína:Água ultrapura:Poloxamer 407. Fonte: Elaboração própria.

Estatisticamente (Fig. 13) as formulações foram analisadas intragrupo e entre os grupos, ou seja, intragrupo foram analisadas as formulações isoladas em função do tempo e entre os grupos foram comparadas todas as formulações a cada tempo isolado (1, 7, 15 e 30).

Quando analisados intragrupo as formulações DT1-F6 e DT1-F15 foram diferentes estatisticamente (p<0,05), e as formulações DT1-F20, DT1-F21 e DT2-F21 foram semelhantes (p>0,05). Em análise entre os grupos, nos tempos 1, 15 e 30 dias todas as formulações (DT1-F6, DT1-F15, DT1-F20, DT1-F21 e DT2-F21) foram consideradas estatisticamente semelhantes (p>0,05). Porém, no tempo de 7 dias, as formulações DT1-F6, DT1-F15, DT1-F20 e DT2-F21 foram consideradas estatisticamente semelhantes (p>0,05). Porém, no tempo de 7 dias, as formulações DT1-F6, DT1-F15, DT1-F20 e DT2-F21 foram consideradas estatisticamente semelhantes (p>0,05), e a formulaçõe DT1-F21 foi diferente estatisticamente (p<0,05).

Conforme os resultados do estudo de estabilidade termodinâmica (Fig. 11, Fig. 12 e Fig. 13) foi possível selecionar as formulações de CLL mais estáveis ao longo do período analisado. De acordo com as medidas de potencial zeta, diâmetro de partículas e índice de polidispersidade as formulações DT1-F6, DT1-F21 e DT2-F21 foram selecionadas por apresentar resultados mais apropriados para funcionalizar os *scaffolds* acelulares.

As formulações selecionadas apresentam a mesma proporção de fase oleosa (10%), porém, as formulações DT1-F6 e DT1-F21 foram obtidas com a MO-18-92 e a DT2-F21 foi obtida com a MO-18-99. Quanto a proporção de fase aquosa e hidrótropo, a DT1-F6 apresenta, respectivamente, 60% e 30%. E as formulações DT1-F21 e DT2-F21 foram compostas por 30% de fase aquosa e 60% de hidrótropo. Dessa forma, as formulações selecionadas (DT1-F6, DT1-21 e DT2-21) prosseguiram para avaliação físico-química, sendo caracterizadas por FTIR e DSC.

#### 6.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR foi usado para analisar os grupamentos químicos característicos dos componentes das formulações (MO-18-92, MO-18-99 e P407) e formulações de CLL (DT1-F6, DT1-F21 e DT2-F21) usando FTIR-ATR em modo transmitância. A Figura 14 mostra os resultados dos espectros de infravermelho dos componentes das formulações e formulações de CLL.





Nota: MO-18-92 - Monoleína 18-92; MO-18-99 - Monoleína 18-99; P407 - Poloxamer 407; Formulações de CLL (DT1-F6, DT1-F21 e DT2-F21) compostas por Monoleína:Água ultrapura:P407. Fonte: Elaboração própria.

De acordo com os resultados dos espectros (Fig. 14), as monoleínas (MO-18-92 e MO-18-99) apresentaram bandas referentes ao grupo hidroxila (-OH) em 3.385 cm<sup>-1</sup>, vibração correspondente a ligação CH=CH em 3.007 cm<sup>-1</sup>. Em 2.924 cm<sup>-1</sup> foi relatado como grupo CH<sub>2</sub>, o estiramento em 2.854 cm<sup>-1</sup> foi descrito como grupo éster, e a banda em 1.739 cm<sup>-1</sup> corresponde ao grupo carbonila (C=O) (NILSSON; HOLMGREN; LINDBLOM, 1994; TANG *et al.*, 2008). Nos espectros de P407 foram observados grupo hidroxila, grupo C-H alifático e vibrações de C-O em duas regiões, respectivamente, em 3.500 cm<sup>-1</sup>, 2.889 cm<sup>-1</sup>, 1.469 cm<sup>-1</sup> e 1.109 cm<sup>-1</sup> (WANG et al., 2006; JINDAL; MEHTA, 2015; LI *et al.*, 2017).

Nos espectros das formulações na DT1-F6 foi possível observar bandas correspondentes ao grupo -OH, vibrações de CH<sub>2</sub>, estiramento de C=O e C-O, respectivamente, em  $3.479 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2.928 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1.649 \text{ cm}^{-1}$  e  $1.084 \text{ cm}^{-1}$ . A formulação DT1-F21 apresentou banda correspondente ao grupo -OH em  $3.462 \text{ cm}^{-1}$ , banda em  $2.920 \text{ cm}^{-1}$  foi correspondente a vibração de CH<sub>2</sub>, banda em  $1.651 \text{ cm}^{-1}$  foi descrito como grupo carbonila e vibrações da ligação de C-O em  $1.095 \text{ cm}^{-1}$ . Na formulação DT2-F21 as bandas descrita para grupo -OH, vibrações de CH<sub>2</sub>, grupo carbonila e estiramento de C-O foram observados, respectivamente, em  $3.445 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2.922 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1.649 \text{ cm}^{-1}$  e  $1.093 \text{ cm}^{-1}$ .

O estiramento de ligação C-O (1.084 cm<sup>-1</sup>) na formulação DT1-F6 foi observado em menor intensidade, quando comparada com as formulações DT1-F21 e DT2-F21. Esse resultado pode ser atribuído a diferença de proporção de P407 nas formulações, a DT1-F6 foi composta (em percentual) por 10:60:30, respectivamente, para monoleína, água ultrapura e P407 e as formulações DT1-F21 e DT2-F21 foram compostas (em percentual) por 10:30:60,

respectivamente, para monoleína, água ultrapura e P407. Portanto, as formulações de CLL obtidas apresentaram grupos funcionais característicos de monoleína (MO-18-92 e MO-18-99) e P407, indicando que houve uma interação química entre os componentes das formulações.

#### 6.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A avaliação termoanalítica permitiu identificar as mudanças nas transformações físicoquímicas influenciadas pelo aquecimento dos componentes das formulações (MO-18-92, MO-18-99 e P407) e formulações de CLL (DT1-F6, DT1-F21 e DT2-F21). Essa análise foi realizada usando DSC, e os resultados dos termogramas estão apresentados na Figura 15 e na Tabela 4 são mostrados os resultados de temperatura de fusão e entalpia calorimétrica ( $\Delta$ H).



avaliados por DSC



Nota: MO-18-92 - Monoleína 18-92; MO-18-99 - Monoleína 18-99; P407 - Poloxamer 407; Formulações de CLL (DT1-F6, DT1-F21 e DT2-F21) compostas por Monoleína: Água ultrapura: P407. Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4 - Resultados da temperatura de fusão e entalpia de calorimétrica dos componentes das formulações e formulações de CLL avaliados por DSC

Amostras		Parâmetros avaliados		
		Temperatura de fusão (°C)	Entalpia calorimétrica (J/g)	
Monoleína 18-92		46,8	-199,9	
Monoleína 18-99		75,4	-362,3	
Poloxamer 407		56,2	-151,7	
DT1-F6		103,4	-44,7	
DT1-F21	(1º evento térmico)	52,5	-4,2	
	(2º evento térmico)	99,3	-57,4	
DT2-F21	(1º evento térmico)	53,9	-16,5	
	(2º evento térmico)	103,7	-30,1	

Legenda: CLL-DT1-F21 (monoleína 18-92:P407:água ultrapura); CLL-DT2-F21 (monoleína 18-99:P407:água ultrapura).

Fonte: Elaboração própria.

De acordo com os resultados de termogramas (Fig. 15), temperatura de fusão e entalpia calorimétrica (Tab. 4), todas as amostras analisadas apresentaram picos endotérmicos. Na MO-18-92 foi observado um evento térmico à 46,8 °C (início: 46,0 °C; final: 47,9 °C), e na MO-18-99 apresentou um evento térmico à 75,4 °C (início: 59,7 °C; final: 81,5 °C). Esses resultados da monoleína foram diferentes dos encontrados na literatura, onde descrevem temperatura de fusão entre 20,0-37,0 °C, e isso pode ser atribuído a composição e origem da monoleína (CHANG; BODMEIER, 1997; ABE; TAKAHASHI, 2007; BEI *et al.*, 2010; THAPA *et al.*, 2015).

Para P407 foi observado um evento térmico à 56,2 °C (início: 53,6 °C; final: 57,9 °C) semelhante ao descrito por Bei et al., (2010) e Thapa *et al.*, (2015). Nas formulações de CLL, em DT1-F6 foi observado um evento térmico à 103,3 °C (início: 100,7 °C; final: 111,4 °C). Em DT1-F21 apresentaram dois eventos térmicos à 52,5 °C (início: 50,6 °C; final: 55,6 °C) e outro em 99,3 °C (início: 93,7 °C; final: 106,7 °C). Para a DT2-F21 também foram encontrados dois eventos térmicos à 53,9 °C (Início: 48,4 °C; Final: 57,2 °C) e em103,7 °C (início: 98,3 °C; final: 109,5 °C).

Quando comparamos as formulações (DT1-F6, DT1-F21 e DT2-F21) o evento térmico na região entre 25-75 °C para a formulação DT1-F6 apresentou menor intensidade, isso pode ser justificado pela composição da formulação, pois as DT1-F21 e DT2-F21 são compostas com menor concentração de P407. Entretanto, o evento térmico entre 75-125 °C está presente em todas as formulações, indicando e sugerindo a formação das nanopartículas de CLL, devido seu arranjo similar.

Os resultados confirmam que houve uma solubilização, interação entre os componentes das formulações (DT1-F6, DT1-F21 e DT2-F21) e formação de CLL (Fig. 15 e Tab. 4). O DSC é um método frequentemente usado para análise térmica, e comumente, é associado a técnica de microscopia com luz polarizada, para investigar e determinar a formação das nanopartículas de CLL, devido a temperatura ser um processo crucial, para induzir a auto-organização e ordenamento molecular dos CLL (SOUZA *et al.*, 2020).

#### 7 CONCLUSÕES

O diagrama ternário de fases usado na preparação das formulações precursoras de CLL foi eficiente para obter e selecionar as melhores formulações, que apresentaram equilíbrio físico e químico. A diferença do tipo de fase oleosa (MO-18-92 ou MO-18-99) na obtenção das formulações influenciou nos resultados macroscópico, microscópico,

estabilidade termodinâmica (potencial zeta, diâmetro de partícula e índice de polidispersidade) e avaliação físico-química.

As formulações de CLL selecionadas foram caracterizadas como sistema viscoso translúcido. Na avaliação microscópica e físico-química usando DSC pode concluir a obtenção de sistema líquido cristalino anisotrópico com característica similar a CLL de fase hexagonal, devido a presença de arranjo termoanalítico que indicam a auto-organização de CLL.

A estabilidade termodinâmica foi crucial para selecionar as melhores formulações, sendo as DT1-F6, DT1-F21 e DT2-F21 consideradas como mais estáveis ao longo do período analisado (30 dias). Os espectros de FTIR mostraram que as formulações selecionadas (DT1-F6, DT1-F21 e DT2-F21) apresentaram interação química entre os componentes das formulações. Assim, de acordo com esses resultados podemos concluir que as formulações precursoras de CLL obtidas possuem estabilidade termodinâmica, físico-química e potencial para funcionalizar o *scaffold* acelular .

# CAPÍTULO III

# 8 *SCAFFOLD* ACELULAR OBTIDO POR COMPRESSÃO PLÁSTICA: AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICA, MECÂNICA E MORFOLÓGICA

#### 8.1 Resumo gráfico



Fonte: Elaboração própria.

#### 8.2 Introdução

Os *scaffolds* são caracterizados como estruturas tridimensionais porosas, capazes de atuar como análogos e suporte do tecido a ser reparado, para estimular respostas específicas em nível celular, propiciando formação de um novo tecido e recuperação tecidual e funcional do tecido lesionado (BALMERT; LITTLE, 2012; LIU; HOLZWARTH; MA, 2012).

Para aplicação os *scaffolds* necessitam atender alguns requisitos como ser (i) biocompatível e biodegradável; (ii) apresentar superfície porosa e tridimensional; (iii) possuir integridade mecânica para suporte no reparo tecidual; (iv) possuir superfície funcionalizada e topográfica para interagir com as células e (v) mimetizar os aspectos físico-químicos e desempenhar as funções nativas do tecido a ser reparado (SERPOOSHAN *et al.*, 2013; BAOLIN; PETER X., 2014).

O microambiente dos *scaffolds* e escolha dos biomateriais são pontos críticos na projeção da estrutura tridimensional porosa. Os biomateriais podem influenciar na interação microambiente-tecido, e quando funcionalizados podem auxiliar na ancoragem de células dependentes de ancoragem e fixação. Os biomateriais tem como principais propriedades serem não-tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis (SARIG; MACHLUF, 2011; SERPOOSHAN *et al.*, 2013).

Nesse estudo o objetivo foi desenvolver *scaffold* acelular obtido por compressão plástica para aplicação no tecido cardíaco lesionado. Os *scaffolds* acelulares foram caracterizados por propriedades mecânicas usando texturômetro, avaliação morfológica usando microscopia eletrônica de varredura, avaliação morfológica e estrutural por microtomografia computadorizada tridimensional e avaliação físico-química por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e calorimetria exploratória diferencial, estudo de intumescimento e desintegração usando estufa com circulação e renovação de ar e estudo de condutividade elétrica usando condutivímetro.

#### **8.3 Delineamento experimental**

O delineamento experimental desse estudo foi realizado em escala laboratorial, no Laboratório de biomateriais e nanotecnologia da Universidade de Sorocaba (LaBNUS). O desenvolvimento desse estudo para obtenção, caracterização e seleção dos *scaffolds* acelulares estão apresentadas esquematicamente na Figura 16.



Figura 16 - Fluxograma esquemático da obtenção, caracterização e seleção dos scaffolds acelulares

Nota: MEV - Microscopia eletrônica de varredura; FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier; DSC - Calorimetria exploratória diferencial. Fonte: Elaboração própria.

# 9 MATERIAL E MÉTODOS

### 9.1 Material

Colágeno bovino tipo I cedido pela Novaprom Food Ingredients. Especificações físico-químicas: proteína (N x 6.25) > 98%, umidade < 12%, gordura < 3%, cinzas < 5% e pH

(sol. a 12,5%) 6,0-8,0. (Lote: 112520170531, Lins, SP, Brasil), poloxamer 407 $\otimes$  (Sigma-Aldrich, Lote: BCBQ6661V, Saint Louis, EUA), ácido hialurônico 1% (Bioproducts, Lote: 110061, São Paulo, SP, Brasil), fibroína da seda (Bombyx mori) (os casulos do bicho-da-seda foram usados para extrair a solução de fibroína da seda), água ultrapura (18,2 M $\Omega$ .cm-1) e hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica, Lote: 53187, Diadema, SP, Brasil). Todos os reagentes usados foram de grau analítico.

#### 9.2 Métodos

#### 9.2.1 Processo de extração da fibroína da seda (Bombyx mori)

O processo de extração da fibroína da seda (Bombyx mori) foi realizado como descrito por Alves; Aranha; Chaud, (2018) e Komatsu *et al.*, (2017). Resumidamente, os casulos do bicho-da-seda foram cortados e adicionados em solução aquosa de carbonato de sódio (Na2CO3) à 0,5 %, e mantidos à 120 °C por 15 minutos em autoclave (80 Kps). Na sequência, a fibroína foi lavada com água ultrapura e seca à 50 °C em estufa com circulação e renovação de ar (Tecnal, TE-394/2, Piracicaba, São Paulo, Brasil) durante 24 horas. Após secagem, a fibroína foi dispersa em solução de cloreto de cálcio, etanol e água (CaCl2.2H2O -CH3CH2OH - H2O; com razão molar de 1:2:6) à 85 °C em banho termostático (Brookfield, TC 550, Middleborough, EUA). Essa dispersão foi submetida ao processo de diálise em membrana de celulose (limite de massa molar de 14.000 Dalton) por 72 horas sob agitação magnética (Quimis aparelhos científicos, 241.2, Diadema, SP, Brasil), para obter a solução de fibroína da seda (FS). Nesse processo a concentração final de FS pode variar entre 2,0-3,0%, essa concentração foi determinada pela massa remanescente de FS após secagem.

#### 9.2.2 Preparação e obtenção dos scaffolds acelulares

O desenvolvimento dos *scaffolds* acelulares envolveu duas etapas (i) preparação de hidrogel e (ii) compressão plástica. Resumidamente, a preparação de hidrogel consiste na dispersão de colágeno bovino tipo I (COL), ácido hialurônico (AH), solução de fibroína da seda (SF) e poloxamer 407® (P407) em água ultrapura (m/v). Essa dispersão foi agitada manualmente até obter uma mistura homogênea e, em seguida, o pH foi ajustado para 10, usando NaOH 2M. Após esse processo, a dispersão foi transferida para recipiente cilíndrico com capacidade volumétrica de 10 mL (diâmetro e altura de 20 mm) e mantida em refrigerador à 10±1 °C (Brastemp, BRM42EB, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) por 24 horas para promover reticulação.

A compressão plástica do hidrogel foi realizada com prensa hidráulica (Shimadzu, SSP-10A. Kyoto, Japão) aplicando uma força de compressão estática (de cima pra baixo) de 4 KN durante 10 minutos, de acordo com a técnica descrita por Alves et al., (2018). Após a compressão, as formulações foram ultracongeladas à -80 °C (UFR30, Liotop, São Carlos, SP, Brasil) e liofilizadas (L101, Liotop, São Carlos, SP, Brasil) por 24 horas. Nesse estudo foram obtidas quatro diferentes formulações (FA-FD), que variam na concentração de AH (Tabela 5).

 Tabela 5 - Composição das formulações dos scaffolds acelulares (FA-FD)

 Formulações

Composição (m/y)	Formulações				
Composição (m/v)	FA	FB	FC	FD	
Colágeno bovino tipo I (COL)	5,0 g	5,0 g	5,0 g	5,0 g	
Ácido hialurônico 1% (AH)	-	2,4 g	1,2 g	0,18g	
Fibroína da seda 3% (FS)	0,08 g	0,08 g	0,08 g	0,08 g	
Poloxamer 407 <sup>®</sup> (P407)	0,04 g	0,04 g	0,04 g	0,04 g	
Água ultrapura qsp.	74,88 mL	72,48 mL	73,68 mL	74,7 mL	

Fonte: Elaboração própria.

#### 9.2.3 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas (perfuração, resiliência, relaxação, tração e modulo elástico) dos *scaffolds* acelulares foram avaliadas usando texturômetro (Stable Micro Systems. TA-XT Plus, Surrey, Reino Unido). Para ensaio, o equipamento foi calibrado com célula de 5 Kg. Em triplicata, as amostras (25 mm<sup>2</sup>) foram hidratadas em água ultrapura, sendo o excesso removido com papel absorvente. Os parâmetros usados para perfuração, resiliência, relaxação e modulo elástico foi em modo de teste de compressão. Apenas para tração, o modo de teste foi em tensão. A velocidade de teste foi 0,5 mm.s<sup>-1</sup> para resiliência, relaxação e modulo elástico, sendo 1,0 mm.s<sup>-1</sup> para perfuração. A velocidade de pré-teste foi 1,0 mm.s<sup>-1</sup> para resiliência, relaxação, modulo elástico e tração, porém, para perfuração foi 2,0 mm.s<sup>-1</sup> para perfuração, relaxação e 10 mm.s<sup>-1</sup> para perfuração, relaxação e 10 mm.s<sup>-1</sup> para perfuração, relaxação e tração. Todos os ensaios utilizaram uma força de gatilho de 0,049 N. Os resultados foram adquiridos pelo *software Exponent Texture Analysis*.

### 9.2.4 Características morfométricas

As características morfométricas dos *scaffolds* acelulares (porosidade, interconectividade de poros e grau de anisotropia) foram avaliados por microtomografia computadorizada tridimensional ( $\mu$ CT). As análises foram realizadas usando microtomografia de raios-X (Brucker-micro-CT-SkyScan 1174v2, Kontich, Bélgica), com tamanho de pixel de

imagem de 17  $\mu$ m, fonte de tensão de 29 kV, fonte de corrente de 661  $\mu$ A e exposição de 4.000 ms. As análises foram adquiridas em modelos virtuais em 3D e os dados foram obtidos pelo *software CT Analyzer v. 1.13.5*.

#### 9.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens das superfícies dos *scaffolds* acelulares foram obtidas usando microscópio eletrônico de varredura (JEOL. JSM-IT200, Tokyo, Japão), com tensão elétrica acelerada de 20kV e magnificação de 100x e 250x. Todas as amostras foram fixadas em porta-amostra, usando uma fita adesiva dupla-face de carbono, em seguida, as amostras foram recobertas com partículas de ouro, usando metalizador de alto vácuo (Smart coater. DII-29010SCTR, Tokyo, Japan) por 4 minutos à 15 mA. Os resultados foram adquiridos pelo *software SEM Operations 3.110*.

#### 9.2.6 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi usada para determinar os grupamentos químicos do COL, AH, SF, P407 e *scaffolds* acelulares (FA-FD). A caracterização foi realizada conforme descrito no item 5.2.4 (Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) - Capítulo II).

#### 9.2.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização termoanalítica de COL, AH, SF, P407 e *scaffolds* acelulares (FA-FD) foram obtidas usando DSC. A análise foi realizada conforme descrito no item 5.2.5 (Calorimetria exploratória diferencial (DSC) - Capítulo II).

#### 9.2.8 Estudo de intumescimento

O estudo de intumescimento foi realizado como descrito por Martínez et al., (2015), com ligeiras modificações. Resumidamente, as amostras (1 cm<sup>2</sup>), em triplicata, foram imersas em 2,0 mL de tampão fosfato de pH 7,4 sob aquecimento à 37±2 °C, em estufa com circulação e renovação de ar. O estudo foi realizado durante 120 horas, com intervalo de 24 horas. Nesse estudo foram realizadas duas medidas, sendo (A) medida que avalia a capacidade de intumescimento da estrutura completa dos *scaffolds* (matriz e sistema de poros). A cada tempo as amostras foram removidas do meio e determinada a massa (Wws); e (B) as amostras eram acomodados e pressionadas em papel de filtro (diâmetro de 90 mm), para remover o líquido intersticial do meio presente no sistema de poros. E novamente as

massas foram verificadas (Wwm), para avaliar a capacidade de intumescimento apenas da matriz. Após esse processo, os *scaffolds* foram secos à 37±2 °C em estufa com circulação e renovação de ar, até atingir massa constante (Wd). Os resultados da capacidade de intumescimento foram expressos em percentual, sendo calculados de acordo com a Eq. (1), onde Ww representa Wws ou Wwm.

Fluído absorvido pelo scaffold (%) = 100 . 
$$\frac{Ww - Wd}{Wd}$$
 (1)

#### 9.2.9 Estudo de desintegração

O estudo de desintegração foi realizado como descrito por Martínez et al., (2015), com ligeiras modificações. Resumidamente, as amostras (1 cm<sup>2</sup>), em triplicata, foram imersas em 2,0 mL de tampão fosfato de pH 7,4, sob aquecimento à  $37\pm2$  °C em estufa com circulação e renovação de ar, para avaliar o perfil de desintegração. As massas das amostras secas (Wd') foram previamente registradas. O estudo foi realizado durante 120 horas, com intervalo de 24 horas. A cada tempo, as amostras eram removidas do meio e secas à  $37\pm2$  °C em estufa com circulação e renovação de ar, até atingir massa constante (Wa). Durante esse período foram realizadas medidas de pH do meio, em triplicata, usando medidor de pH digital (Tecnal, TE-5. Piracicaba, Brasil). Os resultados da perda de massa foram expressos em percentual, sendo calculados de acordo com a Eq. (2).

Perda de massa (%) = 100 . 
$$\frac{Wd' - Wa}{Wd'}$$
 (2)

#### 9.2.10 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey para comparação entre as médias, com intervalo de confiança de 95%. O valor de P <0,05 foi considerado significativo.

#### 10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 10.1 Obtenção dos scaffolds acelulares

Os *scaffolds* acelulares baseados em hidrogel foram obtidos, resumidamente, em três etapas (Figura 17). A dispersão de polímeros é um método amplamente utilizado na área farmacêutica. Neste estudo, a dispersão de polímeros (1) foi utilizada para a obtenção do hidrogel. O hidrogel é conhecido como material constituído do grupo de materiais poliméricos, sendo estruturas hidrofílicas que possuem capacidade de reter grandes quantidades de água, em suas redes tridimensionais. Assim, o hidrogel foi definido como biomaterial intumescido por água, obtido com reticulação polimérica de reação simples de um ou mais monômeros (AHMED, 2015).

A técnica de compressão plástica (2) têm por objetivo promover a compressão de hidrogéis, resultando em *scaffolds* com propriedades mecânicas adequadas para suporte celular. A força de compressão plástica foi aplicada de forma unidimensional, para obter um *scaffold* relativamente denso com camadas (lamelas) sobrepostas. Nesse processo também ocorre a remoção parcial do líquido intersticial, para adquirir um dispositivo acelular tridimensional estruturado, com topografia, porosidade e rigidez adequadas (BROWN *et al.*, 2005; SERPOOSHAN *et al.*, 2013). Após a compressão plástica, a liofilização (3) é a última etapa do processo. A liofilização é um método de ultracongelamento, seguido pelo processo de sublimação, garantindo a remoção completa do líquido intersticial e formação do sistema de poros (VALENCIA *et al.*, 2018).





Fonte: Elaboração própria.

#### 10.2 Propriedades mecânicas

O texturômetro foi usado para medir as propriedades mecânicas, utilizando o modo de compressão ou tração. A Figura 18 mostra os resultados dessas propriedades nos *scaffolds* acelulares (FA-FD). As propriedades mecânicas para *scaffolds* usados na engenharia de tecidos são parâmetros críticos para obter sucesso na aplicação. Os *scaffolds* devem apresentar resistência mecânica e taxa de desintegração adequada, com superfície bioativa para favorecer o rápido reparo tecidual (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011). Conforme descrito por Mano, (1991) essas propriedades estão relacionadas à capacidade dos materiais desenvolverem deformações reversíveis ou irreversíveis. A medida das propriedades mecânicas compreendem as características estruturais de resposta dos materiais à influência mecânica externa.

As propriedades mecânicas avaliadas foram (i) resistência à perfuração (ductilidade) é a capacidade do material se deformar até causar a ruptura, resultando em uma deformação à fratura; (ii) resiliência é uma medida da capacidade dos materiais absorverem energia durante a deformação elástica. Isso significa que os materiais resilientes, retornam ao estado inicial após a remoção da força aplicada; (iii) flexibilidade (módulo de flexão) é uma medida relacionada com a tensão de flexão e a resposta da tensão de flexão, resultando na resposta à deformação em modo de compressão ou tensão perpendicular sob carga, não causando uma fratura no material; (iv) resistência à tração (módulo de elongação) é a tensão máxima que um material pode suportar antes de romper; (v) módulo elástico (módulo de Young) é a medida de deformação em resposta da tensão de tração aplicada, o resultado indica a rigidez do material (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2019a; ELKATATNY *et al.*, 2018).



Figura 18 - Resultados das propriedades mecânicas dos scaffolds acelulares (FA-FD)

Nota: (\*) Significa que há diferença estatística na mesma análise (p<0,05). (\*\*) Significa que não há diferença estatística na mesma análise (p>0,05) (n = 3). Fonte: Elaboração propria.

De acordo com a Fig. 18, na resistência à perfuração (ductilidade) as amostras (FA-FD) foram estatisticamente diferentes (p<0,05). A maior resistência à perfuração foi observada para FD (0,546±0,066 N). Para resiliência, as formulações foram estatisticamente semelhantes (p>0,05) entre FA; FD e FB; FC. Os *scaffolds* em FA (0,283±0,028 N) e FD (0,270±0,015 N) foram considerados mais resilientes. Para flexibilidade, todas as formulações (FA-FD) foram estatisticamente semelhantes (p>0,05), sendo FD (0,188 ± 0,009 N) a formulação com maior flexibilidade.

Para resistência à tração (módulo de elongação), as formulações FA e FB foram estatisticamente semelhantes (p>0,05), e a FC e FD foram estatisticamente diferentes (p<0,05). A formulação FD (0,626  $\pm$  0,060 N) apresentou uma maior resistência à tração. Para o módulo elástico, as formulações (FA-FD) não apresentaram diferenças estatísticas (p>0,05). Esses resultados confirmam, que a variação da concentração de AH no desenvolvimento dos *scaffolds* acelulares (FA-FD) influenciaram nas propriedades mecânicas, principalmente, para perfuração, resiliência e tração, sendo os melhores resultados encontrados para a formulação FD (0,6%).

#### 10.3 Características morfométricas

As características morfológicas e morfométricas do *scaffolds* acelulares (FA-FD) foram avaliadas usando microtomografia computadorizada tridimensional (µCT). Os

resultados das características morfológicas foram apresentados na Figura 19, e na Tabela 6 os dados numéricos das características morfométricas.

Figura 19 - Resultados das imagens morfológicas dos *scaffolds* acelulares (FA-FD) avaliados por microscopia computadorizada tridimensional



Nota: As setas indicam as áreas com porosidade. Fonte: Elaboração própria.

Tabela 6 - Resultados numén	icos das características	morfométricas dos	s <i>scaffolds</i> acelulares (	FA-FD)
avaliados	por microtomografia co	mputadorizada trid	limensional	

Danâmatras avaliadas	Formulações			
Farametros avanados	FA	FB	FC	FD
Interconectividade de poros (%)	76,20	76,00	74,86	74,96
Volume de poros abertos (mm <sup>3</sup> )	6,74	6,58	4,67	7,29
Poros fechados (%)	0,08	0,07	0,07	0,07
Grau de anisotropia	0,64	0,59	0,40	0,88

Fonte: Elaboração própria.

De acordo com as características morfológica (Fig. 19) foi possível observar a diferença de densidade e presença de poros entre as formulações (FA-FD). A formulação FD apresentou maior densidade, e esse resultado pode ser observado pelas áreas de coloração azul (Fig. 19-FD). Esse fenômeno ocorre, possivelmente, devido a um maior grau de reticulação (SILVA *et al.*, 2014). Nas características morfométrica (Tab. 6) constatou que a variação da concentração de AH influenciou nos resultados. Os resultados de FD (AH 0,6 %) foram significativos, apresentando uma interconectividade de poros adequada (74,96 %), com maiores valores encontrados para volume de poros abertos (7,29 mm<sup>3</sup>) e grau de anisotropia (0,88).

A medida da porosidade é um parâmetro crítico a ser avaliado na projeção de *scaffolds*. Esse microambiente e a arquitetura são projetados para oferecer suporte à diferenciação e organização celular, prevenindo morte celular dependente de ancoragem. Assim, a escolha dos biomateriais é importante para desenvolvimento do dispositivo biomédico, pois o *scaffold* deve desempenhar funções biológicas, químicas e mecânicas para

atrair as células nativas dos tecidos e promover ancoragem para as células dependentes de fixação (ELTOM; ZHONG; MUHAMMAD, 2019; RANE; CHRISTMAN, 2011; SARIG; MACHLUF, 2011).

Além da porosidade, a medida do grau de anisotropia também é fundamental para influenciar e levar a novas diferenciações dos tecidos (MULDER; BUMA; HANNINK, 2009). A medida do grau de anisotropia pode ser influenciada pela escolha do método. Assim, a técnica de compressão plástica, seguida por liofilização tem sido amplamente utilizada em dispositivos tridimensionais porosos. Os *scaffolds* acelulares fabricados por ultracongelamento, formam dispositivos com estrutura de poros anisotrópicos (ALVES *et al.*, 2019a).

Valores com grau de anisotropia próximos a zero, indicam que são estruturas isotrópicas, e valores próximos a 1 são estruturas anisotrópicas. Os *scaffolds* com características isotrópicas não têm relação estrutural e funcional com tecido nativo, mas quando os *scaffolds* têm características anisotrópicas e são fabricados com relação direta na organização do tecido nativo, apresentam semelhança estrutural hierárquica em diversos tipos de células da MEC, como o colágeno. O reparo tecidual com *scaffold* anisotrópico pode ser mais eficaz por apresentar arranjo arquitetônico, e ser anatomicamente mais semelhante ao tecido nativo e a morfologia celular (MULDER; BUMA; HANNINK, 2009).

#### 10.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens microscópicas usando MEV da superfície dos *scaffolds* acelulares (FA-FD), com magnificação de 100x e 250x são apresentadas na Figura 20. Os resultados comparam as características morfológicas de superfície dos *scaffolds* acelulares (FA-FD). Desta forma, de acordo com a Fig. 20 foi possível observar microestruturas porosas regulares contínuas e uniformemente distribuídas com poros interligados, porém visualmente é possível observar a diferença da conformação e arranjo dos poros nas formulações (FA-FB). Assim, esses resultados corroboram com os resultados analisados pela microtomografia computadorizada tridimensional (Fig. 19 e Tab. 6). A faixa de tamanho dos poros para os *scaffolds* acelulares foram entre, respectivamente, 104-142 µm, 80-108 µm, 70-108 µm, e 90-113 µm para as formulações FA, FB, FC e FD.



Figura 20 - Resultados das imagens microscópicas dos *scaffolds* acelulares (FA-FD) com magnificação de 100x e 250x caracterizadas por MEV

Fonte: Elaboração própria.

# 10.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR foi usado para analisar os grupamentos químicos característicos e as interações entre os componentes das formulações e os *scaffolds* acelulares, utilizando FTIR no modo de transmitância. A Figura 21 mostra os resultados dos espectros de FTIR dos componentes das formulações (COL, AH, FS e P407) (Fig. 21-A) e *scaffolds* biomimético acelulares (FA-FD) (Fig. 21-B).



Figura 21 - Resultados dos espectros dos (A) componentes das formulações (COL, AH, FS e P407) e (B) *scaffolds* acelulares (FA-FD) avaliados por FTIR

Nota: (A) COL - Colágeno bovino tipo I; AH - Ácido hialurônico; SF - Solução de fibroína da seda; P407 - Poloxamer 407. (B) Formulações de *scaffolds* acelulares (FA-FD). Fonte: Elaboração própria.

Nos espectros de infravermelho dos componentes das formulações (Fig. 21-A) foram observados para COL bandas em 3.450 cm<sup>-1</sup> e 2.850 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, correspondentes dos grupos -OH e -CH<sub>3</sub>. A banda em 1.635 cm<sup>-1</sup> foi característica de amida I, correspondendo à absorção que surge principalmente de estiramento da vibração de C=O. Em 1.527 cm<sup>-1</sup> está relacionada para amida II (N-H) e grupo C-N. Na banda de 1.240 cm<sup>-1</sup> foi relatado como estiramento de amida III. A banda observada em 1.448 cm<sup>-1</sup> e na região de 1.417-1.360 cm<sup>-1</sup> foram descritas como estereoquímica dos anéis de pirrolidina de prolina e hidroxiprolina (ALVES et al., 2018; LEÓN-MANCILLA *et al.*, 2016).

Nos espectros do AH foram observados bandas entre 3.200-3.650 cm<sup>-1</sup> correspondente do grupo -OH. As bandas entre 1.630-1.680 cm<sup>-1</sup> apresentaram estiramentos referente ao grupo amida (-CO-NH). E entre 1.000-1.300 cm<sup>-1</sup> foi corresponde ao grupo carbonila (C=O) (LIM *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2013). O espectro de FS apresentou bandas em 1.643 cm<sup>-1</sup>, 1.527 cm<sup>-1</sup> e 1.238 cm<sup>-1</sup> sendo, respectivamente, amida I, amida II e amida III (ALVES *et al.*, 2018). Nos espectros de P407 foram observados grupo hidroxila em 3.500 cm<sup>-1</sup>, o pico em 2.889 cm<sup>-1</sup> corresponde ao grupo C-H alifático e as vibrações de C-O foram apresentadas em 1.469 cm<sup>-1</sup> e 1.109 cm<sup>-1</sup> (JINDAL; MEHTA, 2015; LIU *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2006).

Nos espectros dos *scaffolds* acelulares (Fig. 21-B) foi possível observar estiramentos característicos, indicando que houve interação química entre os componentes das formulações. Especificamente para espectros de FD, foi possível observar maior intensidade na região entre 3.200-3.650 cm<sup>-1</sup>, referente ao grupo hidroxila (-OH) semelhante ao estiramento de AH na forma natural.
#### 10.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A avaliação termoanalítica permitiu identificar as mudanças nas transformações físicoquímica influenciada pelo aquecimento nos componentes das formulações (COL, AH, SF e P407) e *scaffolds* acelulares (FA-FD). Essa análise foi realizada usando DSC e os resultados estão apresentados na Figura 22. De acordo com os resultados, as curvas dos termogramas de DSC para os componentes das formulações (Fig. 22-A) e os *scaffolds* acelulares (Fig. 22-B) apresentaram picos endotérmicos.

Figura 22 - Resultados das curvas dos termogramas dos (A) componentes das formulações (COL, AH, SF e P407) e os *scaffolds* acelulares (B) avaliados por DSC



Nota: (A) COL - Colágeno bovino tipo I; AH - Ácido hialurônico; SF - Solução de fibroína da seda; P407 - Poloxamer 407. (B) Formulações de *scaffolds* acelulares (FA-FD). Fonte: Elaboração própria.

Na Fig. 22-A, no termograma de COL foram observados três eventos térmicos, sendo à 85,7 °C (início: 39,7 °C; final: 124,7 °C) com entalpia calorimétrica ( $\Delta$ H) de -203,8 J/g. Esse pico foi associado à perda de água das fibras de colágeno. Esse fenômeno é indicativo de desnaturação do colágeno (Td), com o aumento da temperatura ocorre a quebra das ligações de hidrogênio entre as triplas hélices, resultando na desidratação da rede em torno da molécula de colágeno (BADEA; USACHEVA; DELLA GATTA, 2015; LEÓN-MANCILLA *et al.*, 2016). Pico à 226,8 °C (início: 217,4 °C; final: 231,9 °C) está relacionado à temperatura de transição vítrea (Tg). E o último pico observado para COL foi 272,6 °C (início: 253,7 °C; final: 290,7 °C;  $\Delta$ H: -27,0 J/g), sendo correlacionado à decomposição de proteínas, devido à perda de ligações de hidrogênio (ALVES *et al.*, 2018; LEÓN-MANCILLA *et al.*, 2016).

No termograma do AH foi observado um evento térmico à 120,1 °C (início: 117,9 °C; final: 122,8 °C; ΔH: -8,2 J/g), sugerindo uma temperatura de fusão, esse resultado é semelhante como descrito por Alves *et al.*, (2019). A curva de termograma de SF foram analisados dois eventos térmicos, sendo um pico em 69,0 °C (início: 44,4 °C; final: 88,9 °C;  $\Delta$ H: -58,3 J/g), indicando evaporação de água, e o outro evento à 290,8 °C (início: 273,1 °C; final: 300,0 °C;  $\Delta$ H: -154,8 J/g) foi atribuído como decomposição térmica (ALVES; ARANHA; CHAUD, 2018). Para o P407 foi observado um evento térmico à 56,1 °C (início: 53,6 °C; final: 57,9 °C;  $\Delta$ H: -151,7 J/g), sugerindo uma temperatura de fusão (THAPA *et al.*, 2015).

A Fig. 22-B apresentou os termogramas para as formulações de *scaffolds* acelulares (FA-FD), nas curvas não foram encontrados eventos térmicos de AH, FS e P407. Dessa forma, todas as amostras apresentaram eventos térmicos entre 25-100 °C atribuídos ao COL (Td), sendo semelhante à forma natural, sugerindo que os biopolímeros formaram uma mistura miscível. No evento térmico em 230 °C foi atribuído como relaxamento das cadeias do COL, ocorrendo uma transição hélice-bobina que indica uma extensão intermolecular da reticulação (ALVES *et al.*, 2019a). Os resultados numéricos dos picos, início, final e  $\Delta$ H dos *scaffolds* acelulares estão apresentados na Tabela 7.

Parâmetros avaliados	Formulações					
	FA	FB	FC	FD		
Pico (°C)	70.2	68.9	73.0	74.8		
Início (°C)	46.0	44.9	42.3	47.2		
Final (°C)	93.1	93.2	98.3	107.2		
Entalpia calorimétrica - $\Delta H (J/g)$	-55.7	-81.6	-110.7	-125.3		

Tabela 7 - Resultados numéricos dos picos, início, final e entalpia calorimétrica dos scaffoldsacelulares (FA-FD) por DSC

Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a Fig. 22-B e Tab. 7, foi possível sugerir que os eventos térmicos observados foram influenciados pela composição dos *scaffolds* acelulares, sendo a principal diferença a composição entre FA-FD, variando a concentração de AH. Comparando os resultados (Tab. 7), na amostra com 3% de AH (FB) o valor do pico (Td) diminui, mas quando houve a diminuição da concentração de AH para 1,5% (FC) e 0,6% (FD) os resultados do pico (Td) aumentaram. O pico (Td) é uma medida que representa a densidade de reticulação. Assim, quando ocorre uma rigidez das triplas hélices do colágeno, resulta em baixa taxa de desnaturação (Td), causando em uma maior temperatura de fusão (LAKRA *et al.*, 2014). Logo a menor taxa de desnaturação do colágeno foi observada na formulação FD.

Os resultados de  $\Delta$ H (Tab. 7) foram inversamente proporcional, quando diminuiu a concentração de AH o  $\Delta$ H aumentou, sendo FD > FC > FB > FA. Esses resultados podem ser explicados pelo aumento das ligações de hidrogênio. Conforme descrito por Meyer (2019), os

valores de  $\Delta$ H refletem diretamente no número de ligações de hidrogênio, sendo um parâmetro sensível do grau da estrutura das triplas hélices. As triplas hélices do colágeno são mantidas associadas entre as ligações de hidrogênio, promovendo uma rede intramolecular e intermolecular, essas ligações resultam em maior estabilidade do colágeno (reticulação) (LAKRA *et al.*, 2014). Esses achados indicam que houve interação entre os biopolímeros, sendo o melhor resultado encontrado na formulação FD (AH 0,6%).

#### 10.7 Estudo de intumescimento e desintegração

O estudo de intumescimento foi usado para avaliar a capacidade de absorção de fluídos dos *scaffolds* acelulares em tampão fosfato (pH 7,4 à 37 °C). Esse estudo avalia a capacidade de absorção de fluído nos scaffolds, sendo influenciado pelo grau de reticulação. Assim, uma menor capacidade de intumescimento reflete na alta densidade de reticulação, resultando em menor flexibilidade e redução do volume livre entre as cadeias poliméricas (YANG; RITCHIE; EVERITT, 2017).

O estudo de desintegração foi usado para avaliar perda de massa, perfil de desintegração e resistência dos *scaffolds* acelulares em tampão fosfato (pH 7,4 à 37 °C). A desintegração é um fenômeno complexo, que depende de fatores intrínsecos dos *scaffolds*, como propriedades morfológicas e topográfica, estrutural, percentual de poros, grau de anisotropia, grau de reticulação e hidrofilicidade (MARTÍNEZ *et al.*, 2015).

Os resultados do estudo de intumescimento e desintegração para FA-FD indicaram alta capacidade de absorção de fluído e desintegração, pois as amostras se desintegraram completamente após 24 horas de contato com tampão fosfato. Esses resultados podem ser explicados, devido ausência ou reticulação limitada impedindo uma formação de ligações mais estáveis. Diante disso há uma necessidade de otimização das formulações e duas estratégias foram adotadas, sendo (i) adição de agentes reticulantes e (ii) aumento da concentração de fibroína.

Os agentes reticulantes são compostos que podem atuar no processo de reticulação, influenciando na formação de redes quimicamente mais estáveis (SAMPAIO *et al.*, 2015). A reticulação é um ponto crítico na estabilização das moléculas de COL e tem como função promover as ligações entre os grupos funcionais da cadeia polimérica, por meio de ligações covalentes, iônicas ou hidrogênio (RADHAKRISHNAN; NAGARAJAN; BECHELANY, 2020).

Outra estratégia para diminuir o perfil de desintegração e capacidade de intumescimento está no aumento da concentração de fibroína. A fibroína (conformação em folhas-β) também pode influenciar no processo de reticulação, melhorar as propriedades mecânicas, estrutural e possui características de biodesintegração lenta (KUNDU et al., 2013).

#### 11 CONCLUSÕES

O *scaffold* acelular desenvolvido foi caracterizado como matriz tridimensional porosa, com porosidade confirmada pela avaliação morfológica e estrutural usando  $\mu$ CT e MEV. A variação da concentração do AH influenciou diretamente nas propriedades mecânicas, apresentando diferença na resistência mecânica e característica estrutural. Essas propriedades para os *scaffolds* aplicados na engenharia de tecidos são pontos críticos para obter sucesso na prática clínica. *Scaffolds* acelulares devem suportar uma força mecânica, com superfície bioativa para favorecer reparo do tecido lesionado.

Os termogramas obtidos por DSC e espectros de FTIR confirmaram, respectivamente, a mistura e interação química dos componentes da formulação. O melhor resultado encontrado foi na formulação FD (AH 0,6%). Apesar disso, os resultados obtidos nos estudos de intumescimento e desintegração indicou uma necessidade de otimizar as formulações com agentes reticulantes e ajuste na concentração da fibroína para promover, respectivamente, maior estabilidade química do COL e permitir uma desintegração lenta e melhorar as propriedades mecânicas e estrutural dos *scaffolds*.

# CAPÍTULO IV

## 12 OTIMIZAÇÃO DO *SCAFFOLD* ACELULAR OBTIDO POR COMPRESSÃO PLÁSTICA: AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MECÂNICA E MORFOLÓGICA

#### 12.1 Resumo gráfico



Fonte: Elaboração própria.

#### 12.2 Introdução

Os *scaffolds* são estruturas tridimensionais porosas que têm como principal função ser suporte temporário para que as células possam aderir, migrar, proliferar e diferenciar, propiciando a formação de um novo tecido. Os *scaffolds* também devem fornecer alguns requisitos necessários para recuperação de tecido, como mimetizar as propriedades estruturais, mecânicas, não ser citotóxico e imunogênico, promover a fixação e ancoragem celular e favorecer o transporte de nutrientes e produtos metabólicos (CHAN; LEONG, 2008; ARNAL-PASTOR *et al.*, 2013).

Para projeção dos *scaffolds* a escolha dos biomateriais para composição e o método de fabricação são parâmetros críticos. A variedade de processos utilizados na fabricação de *scaffolds* podem modificar as propriedades da superfície e volume, influenciando na arquitetura quanto à similaridade do *scaffold* com o tecidos nativo, podem ativamente fornecer sinais bioativos para mediar uma adesão das células residentes com o microambiente, bem como orquestrar as atividades de ambos os tipos celulares (CHAN; LEONG, 2008; GU *et al.*, 2014).

Nesse estudo o objetivo foi desenvolver um *scaffold* acelular otimizado para aplicação no tecido cardíaco lesionado. Os *scaffolds* otimizados foram caracterizados por propriedade

mecânica usando texturômetro, estudo de intumescimento e desintegração usando estufa com circulação e renovação de ar, avaliação físico-química por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e calorimetria exploratória diferencial, avaliação morfológica usando microscopia eletrônica de varredura e avaliação morfológica e estrutural por microtomografia computadorizada tridimensional.

#### 12.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental desse estudo foi realizado em escala laboratorial, no Laboratório de biomateriais e nanotecnologia da Universidade de Sorocaba (LaBNUS). De acordo com os resultados obtidos no Capítulo III, a melhor formulação foi selecionada e otimizada. Para essa otimização foram adotadas duas estratégias, sendo (i) aumento na concentração da fibroína da seda (FS); e (ii) incorporação de agentes reticulantes. O desenvolvimento desse estudo está apresentado esquematicamente na Figura 23.





Nota: FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier; DSC - Calorimetria exploratória diferencial; MEV - Microscopia eletrônica de varredura;  $\mu$ CT - Microtromografia computadorizada tridimensional.

Fonte: Elaboração própria.

#### 13 MATERIAL E MÉTODOS

#### 13.1 Material

Colágeno bovino tipo I cedido pela Novaprom Food Ingredients. Especificações físicoquímicas: proteína (N x 6.25) > 98%, umidade < 12%, gordura < 3%, cinzas < 5% e pH (sol. a 12,5%) 6 a 8. (Lote: 112520170531, Lins, SP, Brasil), poloxamer 407® (Sigma-Aldrich, Lote: BCBQ6661V, Saint Louis, EUA), ácido hialurônico 1% (Bioproducts, Lote: 110061, São Paulo, SP, Brasil), fibroína da seda (*Bombyx mori*) (os casulos do bicho-da-seda foram usados para extrair a solução de fibroína da seda), água ultrapura (18,2 M $\Omega$ .cm<sup>-1</sup>), difenil fosforil azida 97% (Sigma-Aldrich, Lote: MKBZ0923V, Saint Louis, EUA) e os polifenóis isolados do suco da romã (*Punica granatum L*.) em meio aquoso (fruto colhido em Sorocaba, São Paulo, Brasil). Todos os reagentes usados foram de grau analítico.

#### 13.2 Métodos

#### 13.2.1 Processo de extração da fibroína da seda (Bombyx mori)

O processo de extração da solução de fibroína da seda (*Bombyx mori*) foi preparada e adaptada como descrito por Alves; Aranha; Chaud, (2018) e Komatsu *et al.*, (2017). Como descrito no item 9.2.1 (Processo de extração da fibroína da seda (*Bombyx mori*) - Capítulo III).

#### 13.2.2 Processo de isolamento de polifenóis do suco da romã (Punica granatum L.)

O processo de isolamento de polifenóis do suco da romã foi realizado conforme descrito no artigo "*Polyphenols isolated from pomegranate juice (Punica granatum L.): Evaluation of physical-chemical properties by FTIR and quantification of total polyphenols and anthocyanins content*", publicado pela revista *Brazilian Journal of Development* em setembro de 2020. O artigo completo está apresentado em anexo (Anexo B).

#### 13.2.3 Preparação e obtenção dos scaffolds acelulares otimizados

O desenvolvimento dos *scaffolds* acelulares otimizados envolveu duas etapas (i) preparação de hidrogel e (ii) compressão plástica. Resumidamente, a preparação de hidrogel consiste na dispersão de COL, AH, SF, P407 e agentes reticulantes (PSR ou DPPA) em água ultrapura (m/v). Após obter a mistura homogênea, o pH foi ajustado para 10 usando NaOH 2M. A dispersão foi colocada em recipiente com capacidade volumétrica de 10 mL (diâmetro e altura de 20 mm) e mantida em refrigerador à 10±1 °C por 24 horas para promover reticulação.

A compressão plástica do hidrogel foi realizada com prensa hidráulica, aplicando uma força de compressão estática (de cima pra baixo) de 4 KN durante 10 minutos, de acordo com a técnica descrita por Alves et al., (2018). Após essa compressão, as formulações foram ultracongeladas à -80 °C e liofilizadas por 24 horas. Nesse estudo foram obtidas seis

diferentes formulações, tendo como base a formulação selecionada no Capítulo III (FD), com modificações na concentração da solução de fibroína da seda e adição dos agentes reticulantes (PSR ou DPPA). A concentração dos agentes reticulantes variou entre 0,01-0,03%, obtendo três formulações com PSR, sendo identificadas como RA, RB e RC e três formulações com DPPA foram denominadas como RA, RB e RC. Essas formulações estão apresentadas na Tabela 8.

1	5	5	55		<b>`</b>		
Composição (m/v)	Formulações						
	RA	RB	RC	DA	DB	DC	
COL	5,0 g	5,0 g	5,0 g	5,0 g	5,0 g	5,0 g	
AH 1%	0,18 g	0,18 g	0,18 g	0,18 g	0,18 g	0,18 g	
FS 3%	0,80 g	0,80 g	0,80 g	0,80 g	0,80 g	0,80 g	
P407	0,04 g	0,04 g	0,04 g	0,04 g	0,04 g	0,04 g	
PSR	0,008 g	0,016 g	0,024 g	-	-	-	
DPPA 97%	-	-	-	0,008 g	0,016 g	0,024 g	
Água ultrapura qsp.	73,98 mL	73,97 mL	73,96 mL	73,98 mL	73,97 mL	73,96 mL	

**Tabela 8 -** Composição das formulações dos scaffolds acelulares otimizados (RA-RC e DA-DC)

Nota: COL - Colágeno bovino tipo I; AH - Ácido hialurônico; FS - Fibroína da seda; P407 - Poloxamer 407<sup>®</sup>; PSR - Polifenóis isolados do suco da romã em meio aquoso e difenil fosforil azida (DPPA). Fonte: Elaboração própria.

#### 13.2.4 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* foram avaliadas usando texturômetro. A análise foi realizada como descrito no item 9.2.3 (Propriedades mecânicas - Capítulo III).

#### 13.2.5 Estudo de intumescimento

O estudo de intumescimento foi realizado para avaliar a capacidade de intumescimento da estrutura completa dos *scaffolds* (matriz e sistema de poros) (A) e medida da capacidade de intumescimento do próprio material (matriz) (B). Essa análise foi realizada como descrito no item 9.2.9 (Estudo de intumescimento - Capítulo III).

#### 13.2.6 Estudo de desintegração

O estudo de desintegração foi usado para avaliar o perfil de desintegração e resistência dos s*caffolds*. Essa análise foi realizada como descrito no item 9.2.8 (Estudo de desintegração - Capítulo III).

#### 13.2.7 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi usada para determinar os grupamentos químicos dos componentes das formulações (COL, AH, SF, P407, PSR e DPPA) e *scaffolds*. A caracterização foi realizada conforme descrito no item 5.2.4 (Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) - Capítulo II). Neste capítulo foi realizado um estudo de mistura física com finalidade de comparar os resultados.

#### 13.2.8 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização termoanalítica dos componentes das formulações (COL, AH, SF, P407, PSR e DPPA) e *scaffolds* foram obtidas usando DSC. A análise foi realizada conforme descrito no item 5.2.5 (Calorimetria exploratória diferencial (DSC) - Capítulo II). Neste capítulo foi realizado um estudo de mistura física com finalidade de comparar os resultados.

#### 13.2.9 Seleção das formulações dos scaffolds acelulares

As melhores formulações dos *scaffolds* foram selecionadas pelos ensaios de propriedades mecânicas, estudo de desintegração e intumescimento, FTIR e DSC.

#### 13.2.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens das superfícies dos *scaffolds* foram obtidas usando MEV, com magnificação de 100x, 250x e 500x. A análise foi realizada como descrito no item 9.2.5 (Microscopia eletrônica de varredura (MEV) - Capítulo III).

#### 13.2.11 Características morfométricas

As características morfométricas dos *scaffolds* foram avaliadas por microtomografia computadorizada tridimensional ( $\mu$ CT). As análises foram realizadas como descritas no item 9.2.4 (Características morfométricas - Capítulo III).

#### 13.2.12 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas usando a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey para comparação entre as médias, com intervalo de confiança de 95%. O valor de P <0,05 foi considerado significativo.

#### 14 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 14.1 Obtenção dos scaffolds acelulares otimizados

Os *scaffolds* acelulares baseados em hidrogel foram obtidos seguindo três etapas, sendo dispersão polimérica, compressão plástica e liofilização, como descrito no Capítulo III. O método empregado permitiu obter *scaffolds* acelulares e tridimensionais, com estrutura uniforme e estável. Como estratégia, nesse estudo foram adicionados agentes reticulantes nas formulações. Os agentes reticulantes podem ser classificados como agente reticulante químico (p.ex. compostos de epóxi, DPPA e glutaraldeído) ou agente reticulante natural (p.ex. genipina, proantocianidinas e antocianinas).

O processo de reticulação permite conectar o grupo funcional da cadeia polimérica em outro, por meio de ligações covalente, iônica ou de hidrogênio (ALVES et al., 2019a; ORYAN et al., 2018). Apesar do uso de ambas reticulações (química ou natural), o agente reticulante natural tem mais vantagens, devido a biocompatibilidade e baixo efeito citotóxico na aplicação clínica (CHOI; KIM; MIN, 2016; ALVES *et al.*, 2019). Na Figura 24 estão apresentadas as formulações (A) hidrogel e (B) *scaffolds* acelulares (RA-RC e DA-DC).

Figura 24 - Resultados macroscópicos das amostras de (A) hidrogel e (B) *scaffolds* acelulares (RA-RC e DA-DC)



Nota: (A) Hidrogel; (B) *Scaffold.* As formulações variaram pelo tipo de agente reticulante (PSR ou DPPA) e concentração entre 0,01-0,03%, sendo com PSR (RA-RC) e com DPPA (DA-DC). Formulações: A1-B1 (DA); A2-B2 (DB); A3-B3 (DC); A4-B4 (RA); A5-B5 (RB) e A6-B6 (RC). Fonte: Elaboração própria.

#### 14.2 Propriedades mecânicas

O texturômetro foi usado para medir as propriedades mecânicas (perfuração, resiliência, flexibilidade, tração e módulo elástico) dos *scaffolds* acelulares, avaliando em modo de compressão ou tração. As propriedades mecânicas são consideradas como parâmetros críticos para aplicação de *scaffolds* biomimético na bioengenharia de tecidos. Os

*scaffolds* devem apresentar resistência mecânica e taxa de desintegração apropriadas, apresentando uma superfície bioativa adequada para o rápido reparo do tecido (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011). Portanto, essas propriedades estão relacionadas diretamente com a capacidade estrutural dos materiais, podendo desenvolver deformações mecânicas reversíveis ou irreversíveis influenciadas por aplicação de uma força mecânica externa (MANO, 1991).

As propriedades mecânicas analisadas foram (i) perfuração (ductilidade) avalia a capacidade de deformação do material, resultando em ruptura (fratura) em modo de compressão; (ii) resiliência mede a capacidade do material absorver energia deformando-se e, retornar ao estado inicial, após uma força exercida; (iii) flexibilidade (módulo de flexão) é uma propriedade que relaciona tensão de flexão com a deformação do material sem causar sua fratura; (iv) resistência à tração (módulo de elongação) é uma tensão máxima exercida no material, a qual promove uma ruptura em modo de tensão; (v) módulo elástico (módulo de Young) é a medida de deformação em resposta da tensão de tração aplicada, o resultado indica a rigidez do material (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2019a; ELKATATNY *et al.*, 2018).

Nesse estudo as propriedades mecânicas (perfuração, resiliência, flexibilidade, tração e módulo elástico) avaliaram a influência da concentração dos agentes reticulantes (PSR ou DPPA), presentes nas formulações dos *scaffolds* acelulares. Os resultados dessas avaliações estão apresentados na Figura 25 para as formulações de RA-RC (PSR) e Figura 26 para as formulações de DA-DC (DPPA).





Nota: As formulações variaram na concentração entre 0,01-0,03% de PSR (RA-RC). (\*) Significa que há diferença estatística na mesma análise (p<0,05). (\*\*) Significa que não há diferença estatística na mesma análise (p>0,05) (n = 3).

Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a Fig. 25, para perfuração todas as formulações (RA-RC) foram estatisticamente diferentes (p<0,05). A maior resistência à perfuração foi observada para RA (0,551±0,060 N). Na resiliência, as formulações RA e RC foram estatisticamente semelhantes (p>0,05), sendo RB estatisticamente diferente (p<0,05). As formulações RA (0,308±0,006 N) e RC (0,306±0,012 N) foram consideradas mais resilientes. Quanto a flexibilidade, todas as formulações (RA-RC) foram consideradas estatisticamente diferentes (p<0,05), sendo RA (0,243±0,032 N) a formulaçõe mais flexível. Na resistência à tração (módulo de elongação) e módulo elástico, em ambas, as formulações RA e RB foram estatisticamente semelhantes (p>0,05), sendo a RC estatisticamente diferente (p<0,05). A formulação RC (0,396±0,009 N) foi consideradas mais resistente à tração, e a formulação RA (0,534±0,014 KPa) foi considerada mais rígida.

Figura 26 - Resultados das propriedades mecânicas dos *scaffolds* biomimético acelulares com difenil fosforil azida (DA-DC) avaliados por texturômetro



Nota: As formulações variaram na concentração entre 0,01-0,03% de DPPA (DA-DC). (\*) Significa que há diferença estatística na mesma análise (p<0,05). (\*\*) Significa que não há diferença estatística na mesma análise (p>0,05) (n = 3). Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a Fig. 26 nas medidas de perfuração, resiliência e módulo elástico, todas as formulações (DA-DC) foram estatisticamente semelhantes (p>0,05). A maior resistência à perfuração (0,175 $\pm$ 0,034 N), resiliência (0,125 $\pm$ 0,041 N) e módulo elástico (0,529 $\pm$ 0,051 KPa) foi observada para formulação DB. Para flexibilidade e resistência à tração (módulo de elongação), todas as foram consideradas estatisticamente diferentes (p>0,05). A formulação RB (0,151 $\pm$ 0,010 N) foi mais flexível, e a formulação RC (0,143 $\pm$ 0,017 N) obteve maior resistência à tração.

Comparando os resultados da Fig. 25 (PSR) e Fig. 26 (DPPA) foi possível observar que o tipo de agente reticulante e a variação da concentração (0,01-0,03%) influenciaram diretamente nas propriedades mecânicas e capacidade estruturais dos *scaffolds* acelulares.

#### 14.3 Estudo de intumescimento

O estudo de intumescimento foi usado para avaliar a capacidade de intumescimento dos *scaffolds* acelulares em tampão de fosfato (pH 7,4 à 37±2 °C), durante 120 horas com intervalo de 24 horas. Essa capacidade foi analisada pela absorção do fluído na estrutura completa (matriz e sistema de poros) e pelo próprio material (matriz) dos *scaffolds*. Todas as formulações apresentaram capacidade de intumescimento, no entanto, as diferenças foram observadas de acordo com tipo e variação da concentração dos agentes reticulantes usados. Os resultados da capacidade de intumescimento da estrutura completa (A) e do próprio material (B) dos *scaffolds* acelulares estão apresentados na Figura 27 para as formulações de RA-RC (PSR) e Figura 28 para as formulações de DA-DC (DPPA).

**Figura 27 -** Resultados da capacidade de intumescimento da (A) estrutura completa (matriz e sistema de poros) e do (B) próprio material (matriz) dos *scaffolds* com polifenóis isolados do suco da romã em meio aquoso (RA-RC)



Nota: As formulações variaram na concentração entre 0,01-0,03% de PSR (RA-RC). (\*) Significa que há diferença estatística na mesma análise (p<0,05). (\*\*) Significa que não há diferença estatística na mesma análise (p>0,05) (n = 3). Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a Fig. 27-A, a capacidade de intumescimento da estrutura completa (matriz e sistema de poros) das formulações RA-RC variou entre 745 e 1.081 %. Nos tempos de 24, 48 e 72 horas, todas as formulações foram estatisticamente semelhantes (p>0,05). Para 96 e 120 horas, as formulações RA e RC foram estatisticamente semelhantes (p>0,05), e RB

apresentou diferença significativa (p<0,05). O máximo grau de intumescimento observado para RA foi em 96 horas (922,56 $\pm$ 0,34) e para as formulações RB (1.102,14 $\pm$ 35,82%) e RC (879,82 $\pm$ 33,43%) foram em 120 horas.

De acordo com a Fig. 27-B, a capacidade de intumescimento do próprio material (matriz) das formulações RA-RC variou entre 565 e 671 %. No tempo de 24 horas, as formulações RA e RB; RB e RC foram estatisticamente semelhantes (p>0,05). Para 48, 96 e 120 horas todas as formulações foram estatisticamente semelhantes (p>0,05). No tempo de 72 horas, as formulações RA e RC foram estatisticamente semelhantes (p>0,05), apresentando diferença significativa para RB (p<0,05). O máximo grau de intumescimento para RA foi observado em 72 horas (619,85±20,43), em 48 horas para RB (632,19±11,20%) e em 96 horas para RC (618,59±31,01%).





Nota: As formulações variaram na concentração entre 0,01-0,03% de DPPA (DA-DC). (\*) Significa que há diferença estatística na mesma análise (p<0,05). (\*\*) Significa que não há diferença estatística na mesma análise (p>0,05) (n = 3). Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a Fig. 28-A, a capacidade de intumescimento da estrutura completa (matriz e sistema de poros) das formulações DA-DC variou entre 795 e 1.016 %. No tempo de 24 horas, as formulações DA e DB; DA e DC foram estatisticamente semelhantes (p>0,05). Em 48 horas, as formulações DA e DB apresentaram diferenças significativas (p<0,05), e DC foi considerada estatisticamente semelhante com DA e DB (p>0,05). Em 72 horas, todas as formulações foram estatisticamente semelhantes (p>0,05). No tempo de 96 horas, DA e DB foram estatisticamente semelhantes (p>0,05). No tempo de 96 horas, DA e DB (p<0,05). Em 120 horas, todas as formulações foram estatisticamente diferença significativa para DC (p<0,05). Em 120 horas, todas as formulações foram estatisticamente diferentes (p<0,05). O

máximo grau de intumescimento para DA (951,42±3,4%) foi observado em 72 horas, em 120 horas para DB (1.016,54±29,53%) e para DC (980,53±3,49%) em 96 horas.

De acordo com a Fig. 28-B, a capacidade de intumescimento do próprio material (matriz) das formulações RA-RC variou entre 575 e 698 %. No tempo de 24, 48, 72 e 96 horas todas as formulações foram estatisticamente semelhantes (p>0,05). E para 120 horas, DA apresentou diferença estatística (p<0,05), e as formulações DB e DC foram estatisticamente semelhantes (p>0,05). O máximo grau de intumescimento para as formulações DA (645,39±21,22%), DB (663,49±20,09%) e DC (698,39±51,91%) foram observados em 72 horas.

Quando comparados os resultados de PSR (Fig. 27) e DPPA (Fig. 28), as formulações RC e DC com maior concentração de agentes reticulantes (0,03%), apresentaram menor capacidade de intumescimento durante período analisado. Esses resultados podem ser explicados, devido ao grau de reticulação obtido nas formulações (RC e DC). A reticulação é considerada um fator crucial na redução ou absorção de fluídos nos *scaffolds* acelulares, ou seja, quando há um aumento no grau de reticulação, ocorre a diminuição da capacidade de intumescimento. Desse modo, o menor perfil de capacidade de intumescimento reflete na alta densidade de reticulação, resultando em menor flexibilidade e redução do volume livre entre as cadeias poliméricas (TRIFKOVIĆ *et al.*, 2015; YANG; RITCHIE; EVERITT, 2017).

#### 14.4 Estudo de desintegração

A perda de massa foi usada para avaliar o perfil de desintegração e a resistência dos *scaffolds* acelulares em tampão de fosfato (pH 7,4 à  $37\pm2$  °C), durante 120 horas com intervalo de 24 horas. O estudo de desintegração é um fenômeno complexo, dependente de fatores intrínsecos dos *scaffolds* como propriedades morfológicas e topográfica, diâmetro, estrutura e percentual de poros, grau de anisotropia, tipo e grau de reticulação e hidrofilicidade (ALVES *et al.*, 2019b; MARTÍNEZ *et al.*, 2015). Os resultados do perfil de desintegração (A) e as medidas de pH (B) estão apresentados na Figura 29 para as formulações de RA-RC (PSR) e Figura 30 para as formulações de DA-DC (DPPA).



(B)

(A)



Nota: (A) Resultados do perfil de desintegração; (B) Resultados das medidas de pH. As formulações variaram na concentração entre 0,01-0,03% de PSR (RA-RC). (\*) Significa que há diferença estatística na mesma análise (p<0,05). (\*\*) Significa que não há diferença estatística na mesma análise (p>0,05) (n = 3). Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a Fig. 29-A, o perfil de desintegração e perda de massa das formulações RA-RC variaram entre 9,01 e 24,24%. No tempo de 24 horas, as formulações foram estatisticamente diferentes (p<0,05), e em 48 horas as formulações foram estatisticamente semelhantes (p>0,05). Para os tempos de 72, 96 e 120 horas as formulações RA e RB foram estatisticamente semelhantes (p>0,05), e a formulação RC foi estatisticamente diferente (p<0,05). Após 120 horas, o maior perfil de desintegração foi observado para as formulações RA (23,40 $\pm$ 0,07%) e RB (24,24 $\pm$ 1,38%) apresentando maiores perda de massa. Assim, o menor perfil de desintegração foi observado para a formulações RC (9,43 $\pm$ 2,00%).

De acordo com a Fig. 29-B, as medidas de pH das formulações RA-RC variou entre 7,35 e 7,58. No tempo de 24 horas, a formulação RA foi considerada diferente (p<0,05) e as formulações RB e RC foram semelhantes (p>0,05). No tempo de 48 horas, as formulações RA e RB foram consideradas diferentes (p<0,05). Porém, a formulação RC foi semelhante com as formulações RA e RB (p>0,05). Em 72 horas, todas as formulações foram semelhantes (p>0,05). Para 96 horas, as formulações RA e RC foram semelhantes (p>0,05). Para 96 horas, as formulações RA e RC foram semelhantes (p>0,05) e houve diferença significativa para RB (p<0,05). No tempo de 120 horas, as formulações RB e RC foram diferentes (p<0,05), porém a formulaçõe RA foi semelhante com as formulações RB e RC (p>0,05), porém a formulaçõe RA foi semelhante com as formulações RB e RC (p>0,05). Após 120 horas o pH para RA, RB e RC foram, respectivamente, 7,35±0,02, 7,32±0,01 e 7,37±0,01. Assim, não houve alterações significativas para degradação hidrolítica.



Figura 30 - Resultados do (A) perfil de desintegração e (B) medidas de pH no estudo de desintegração dos *scaffolds* acelulares com difenil fosforil azida (DA-DC)

Nota: (A) Resultados do perfil de desintegração; (B) Resultados das medidas de pH. As formulações variaram na concentração entre 0,01-0,03% de DPPA (DA-DC). (\*) Significa que há diferença estatística na mesma análise (p<0,05). (\*\*) Significa que não há diferença estatística na mesma análise (p>0,05) (n = 3). Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a Fig. 30-A, o perfil de desintegração e perda de massa das formulações DA-DC variaram entre 4,06 e 22,17%. Nos tempos de 24 e 96 horas, todas as formulações foram estatisticamente semelhantes (p>0,05). Em 48 horas, as formulações DA e DB foram estatisticamente semelhantes (p>0,05), e a formulação DC foi semelhante com DA (p>0,05). Nos tempos de 72 e 120 horas, as formulações DA e DB foram semelhantes (p>0,05), e a formulações DA e DB foram semelhantes (p>0,05), e a formulação DC foi considerada diferente (p<0,05). Após 120 horas, o maior perfil de desintegração foi observado para as formulações DA (22,17±0,2,25%) e DB (18,88±2,22%) apresentando maiores perda de massa. Assim, o menor perfil de desintegração foi observado DC (13,06±2,31%).

De acordo com a Fig. 30-B, as medidas de pH das formulações DA-DC variou entre 7,39 e 7,51. No tempo de 24 horas, as formulações DA e DB foram diferentes (p<0,05), e a formulação DC foi semelhante com as formulações DA e DB (p>0,05). Em 48 e 96 horas, todas as formulações foram consideradas semelhantes (p>0,05). Para 72 e 120 horas, as formulações DA e DC foram semelhantes (p>0,05), e a formulação DB foi diferente (p<0,05). Após 120 horas o pH para DA, DB e DC foram, respectivamente, 7,40±0,01, 7,39±0,01 e 7,41±0,01. Assim, não houve alterações significativas para degradação hidrolítica.

Comparando os resultados de PSR (Fig. 29) e DPPA (Fig. 30), as formulações RC e DC com maior concentração de agentes reticulantes (0,03%) foram consideradas mais resistentes, apresentando menor perfil de desintegração durante o período analisado. Segundo Grover; Cameron; Best, (2012) no *scaffold* não reticulado ocorreu maior perda de massa, com

completa desintegração. Esse resultado reflete na importância da reticulação, que pode atuar na prevenção da rápida desintegração, mantendo a integridade estrutural dos *scaffolds*. A variação da concentração dos agentes reticulantes e o grau de reticulação também fornece maior controle no perfil de desintegração. Portanto, os *scaffolds* que apresentam resistência na desintegração, possuem a capacidade adequada para sustentar a adesão, proliferação e diferenciação celular no tecido a ser reparado, e especificamente para o tecido cardíaco sustentam mecanicamente os ciclos de bombeamento.

#### 14.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR foi usado para analisar os grupamentos químicos e as interações entre os componentes das formulações e os *scaffolds* acelulares, utilizando FTIR no modo de transmitância. A Figura 31 mostra os resultados dos espectros de infravermelho dos componentes das formulações (COL, AH, SF, P407, PSR e DPPA) (Fig. 31-A) e *scaffolds* acelulares (RA-RC e DA-DC) (Fig. 31-B).

**Figura 31** - Resultados dos espectros dos (A) componentes das formulações (COL, AH, SF, P407, PSR e DPPA) e (B) *scaffolds* acelulares (RA-RC e DA-DC) avaliados por FTIR



Nota: (A) COL - Colágeno bovino tipo I; AH - Ácido hialurônico; SF - Solução de fibroína da seda; P407 - Poloxamer 407; PSR - Polifenóis isolados do suco da romã em meio aquoso; DPPA - Difenil fosforil azida. (B) Formulações com PSR (RA-RC) e formulações com DPPA (DA-DC). Fonte: Elaboração própria.

Nos espectros de infravermelho dos componentes das formulações (Fig. 31-A) foram observados para COL em 3.450 cm<sup>-1</sup> estiramentos descrito do grupo hidroxila (-OH), e vibrações de CH<sub>3</sub> em 2.850 cm<sup>-1</sup>. A banda em 1.635 cm<sup>-1</sup> corresponde a amida I, referente a absorção que surge principalmente no estiramento de C=O. Em 1.527 cm<sup>-1</sup> está relacionado a

amida II (N-H) e o grupo C-N. Em 1.240 cm<sup>-1</sup> foi relatado como estiramento de amida III. A banda observada em 1.448 cm<sup>-1</sup> e entre a região 1.417-1.360 cm<sup>-1</sup> foram descritos como estereoquímica dos anéis de pirrolidina de prolina e hidroxiprolina (LEÓN-MANCILLA *et al.*, 2016; ALVES *et al.*, 2018).

No espectro de AH foram observados bandas entre 3.200-3.650 cm<sup>-1</sup> correspondente ao grupo -OH. A banda entre 1.630-1.680 cm<sup>-1</sup> foram descritas como estiramentos de amida (-CO-NH), e 1.000-1.300 cm<sup>-1</sup> correspondem ao grupo carbonila (C=O) (LIM et al., 2011; YU et al., 2013). Os espectros de SF apresentam estiramentos descritos como amida I, amida II e amida III, respectivamente, em 1.643 cm<sup>-1</sup>, 1.527 cm<sup>-1</sup> e 1.238 cm<sup>-1</sup> (ALVES; ARANHA; CHAUD, 2018).

Para P407, as bandas em 3.500 cm<sup>-1</sup> e 2.889 cm<sup>-1</sup>, foram respectivamente, grupo -OH e C-H alifático e as bandas de C-O foram apresentadas em 1.469 cm<sup>-1</sup> e 1.109 cm<sup>-1</sup> (JINDAL; MEHTA, 2015; LIU *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2006). No espectro de PSR (Fig. 37-A) foram observados duas bandas características da romã (*Punica granatum L.*), sendo em 3.421 cm<sup>-1</sup> o grupo hidroxila e em 1.651 cm<sup>-1</sup> foi relacionado ao C=C, sendo as vibração de estiramento dos anéis de benzeno (EDISON; SETHURAMAN, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Nenhum estudo na literatura foi encontrado sobre o espectro de DPPA puro, porém, devido sua estrutura química sugere que em 2.170 cm<sup>-1</sup> correspondem as vibrações de nitrogênio (N<sub>3</sub>) (BENKADDOUR *et al.*, 2013), entre 1.400-1.600 cm<sup>-1</sup> foram referentes as vibrações de C=C, sendo característica dos anéis de benzeno (OLIVEIRA et al., 2016). Em 1.010 cm<sup>-1</sup> foi observado como ligações de C-O (COLDEA et al., 2013), e a banda descrita entre 600-1.110 cm<sup>-1</sup> como grupo fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), podendo ser apresentado na forma simétrica ou assimétrica (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Nos espectros dos *scaffolds* acelulares (Fig. 31-B) foi possível observar bandas e estiramentos característicos, que indicam que houve interação química entre os componentes usados para compor as formulações. E esses resultados corroboram com os observados na mistura física das formulações selecionadas (RC e DC) apresentados na Figura 32.





Nota: (A) COL - Colágeno bovino tipo I; AH - Ácido hialurônico; SF - Solução de fibroína da seda; P407 - Poloxamer 407; PSR - Polifenóis isolados do suco da romã em meio aquoso; DPPA - Difenil fosforil azida. (B) Formulação com PSR (RC) e formulação com DPPA (DC). Fonte: Elaboração própria.

De acordo com os resultados da mistura física e *scaffolds* acelulares (Fig. 32-B), podemos observar que nos *scaffolds* acelulares (RC e DC) não ocorreu apenas uma mistura física, pois os espectros sugerem que também houve uma interação química. Na mistura física, a presença de bandas e estiramentos característicos dos componentes das formulações (COL, AH, FS, P407, PSR ou DPPA) são indícios que não estão associados quimicamente.

#### 14.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A avaliação termoanalítica permitiu identificar as mudanças nas transformações físicoquímicas influenciadas pelo aquecimento nos componentes das formulações (COL, AH, SF, P407, PSR e DPPA) e nos scaffolds biomimético acelulares (DA-DB e RA-RC). Essa análise foi realizada usando DSC, e os resultados estão apresentados na Figura 33. De acordo com os resultados, as curvas dos termogramas de DSC para os componentes das formulações (Fig. 33-A) e os *scaffolds* acelulares (Fig. 33-B).





Nota: (A) COL - Colágeno bovino tipo I; AH - Ácido hialurônico; SF - Solução de fibroína da seda; P407 - Poloxamer 407; PSR - Polifenóis isolados do suco da romã em meio aquoso; DPPA - Difenil fosforil azida. (B) Formulações com PSR (RA-RC) e formulações com DPPA (DA-DC). Fonte: Elaboração própria.

No termograma de COL (Fig. 33-A) foram observados três eventos térmicos, sendo à 85,7 °C (início: 39,7 °C; final: 124,7 °C) com entalpia calorimétrica ( $\Delta$ H) de -203,8 J/g. Esse pico foi associado à perda de água das fibras de colágeno. Esse fenômeno é indicativo de desnaturação do colágeno (Td), com o aumento da temperatura ocorre a quebra das ligações de hidrogênio entre as triplas hélices, resultando na desidratação da rede em torno da molécula de colágeno (BADEA; USACHEVA; DELLA GATTA, 2015; LEÓN-MANCILLA *et al.*, 2016). O Pico em 226,8 °C (início: 217,4 °C; final: 231,9 °C) está relacionado com a temperatura de transição vítrea (Tg). E o terceiro evento térmico à 272,6 °C (início: 253,7 °C; final: 290,7 °C;  $\Delta$ H: -27,0 J/g) foi correlacionado à decomposição de proteínas, devido à perda de ligações de hidrogênio (ALVES *et al.*, 2018; LEÓN-MANCILLA *et al.*, 2016).

No termograma do AH foi observado um evento térmico à 120,1 °C (início: 117,9 °C; final: 122,8 °C;  $\Delta$ H: -8,2 J/g), indicando uma temperatura de fusão, esse resultado é semelhante ao resultado encontrado na literatura (ALVES *et al.*, 2019b). Na curva de termograma de SF (Fig. 38-A) houve um evento térmico à 69,08 °C (início: 44,4 °C; final: 88,9 °C;  $\Delta$ H: -58,3 J/g), indicando evaporação de água, e o outro em 290,8 °C (início: 273,1 °C; final: 300,0 °C;  $\Delta$ H: -154,8 J/g) descrito como decomposição térmica (ALVES; ARANHA; CHAUD, 2018). Para o P407 (Fig. 38-A) foi observado um evento à 56,1 °C (início: 53,6 °C; final: 57,9 °C;  $\Delta$ H: -151,7 J/g), sugerindo a temperatura de fusão (BEI *et al.*, 2010; THAPA *et al.*, 2015).

Na amostra de PSR para temperatura analisada (25-300 °C) não houve eventos térmicos. Porém, alguns estudos relatam uma transição vítrea (Tg) e uma fusão em

temperaturas abaixo de zero, em torno de -50 °C para extratos de romã (AL-RAWAHI *et al.*, 2013; HOBANI; ELANSARI, 2004). No termograma de DPPA (Fig. 33-A), houve um evento térmico à 191,5 °C (início: 177,6; final: 203,8;  $\Delta$ H: -74,4 J/g). Não há estudos na literatura que relate estudo termoanalítico de DPPA puro, contudo, dados do fabricante descreve uma temperatura de ebulição à 157 °C.

A Fig. 33-B apresentou as curvas dos termogramas das formulações (RA-RC e DA-DC). Nos termogramas não foram encontrados eventos térmicos específicos das amostras de AH, FS, P407 e DPPA. Todas as formulações apresentaram eventos térmicos entre 25-100 °C atribuídos ao COL (Td), sendo semelhante à forma natural, indicando que as formulações formaram uma mistura miscível. O evento térmico em 230 °C foi atribuído a um relaxamento das cadeias do COL, ocorre uma transição hélice-bobina indicando uma extensão intermolecular da reticulação (ALVES *et al.*, 2019a). Os resultados numéricos dos picos, início, final e  $\Delta$ H dos *scaffolds* acelulares estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados numéricos dos picos, início, final e entalpia calorimétrica dos scaffoldsacelulares (RA-RC e DA-DC) avaliados por DSC

Parâmetros avaliados	Formulações					
	RA	RB	RC	DA	DB	DC
Pico (°C)	71,9	75,6	75,6	79,9	74,3	79,1
Início (°C)	39,9	45,3	42,5	46,2	46,8	46,0
Final (°C)	104,3	108,9	117,6	111,0	112,0	109,8
Entalpia calorimétrica - ΔH (J/g)	-166,5	-167,1	-241,3	-191,1	-181,9	-207,1

Nota: *Scaffolds* biomimético com PSR (RA-RC) e *Scaffolds* biomimético com DPPA (DA-DC). Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a Fig. 33-B e Tab. 9, foi possível sugerir que os eventos térmicos observados foram influenciados pela composição dos *scaffolds* acelulares, sendo a principal diferença o tipo e concentração do agente reticulante usados. Comparando os resultados (Tab. 10), para as formulações com PSR (RA-RC), o aumento da concentração do agente reticulante (0,01-0,03%) foi proporcional ao aumento do pico (Td) e  $\Delta$ H. Nas formulações com DPPA (DA-DC), quando houve aumento da concentração do agente reticulante (0,01-0,03%), causou uma diminuição do pico (Td) e o maior valor de  $\Delta$ H foi observado para DC.

O pico (Td) é uma medida que representa a densidade de reticulação. Assim, quando ocorre uma rigidez das triplas hélices do colágeno, resulta em baixa taxa de desnaturação (Td), causando uma maior temperatura de fusão (LAKRA *et al.*, 2014). Conforme descrito por Meyer (2019), os valores de  $\Delta$ H refletem diretamente no número de ligações de hidrogênio, sendo um parâmetro sensível do grau da estrutura das triplas hélices. As triplas

hélices do colágeno são mantidas associada entre as ligações de hidrogênio, promovendo uma rede intramolecular e intermolecular, essas ligações resultam em maior estabilidade do colágeno (reticulação) (LAKRA *et al.*, 2014).

De acordo com os resultados, as formulações RC e DC compostas por 0,03% de agente reticulante (PSR ou DPPA) apresentaram maior grau de reticulação, devido ao aumento da capacidade calorimétrica ( $\Delta$ H). Esse parâmetro está relacionado diretamente ao aumento das ligações de hidrogênio nas formulações. Na Figura 34 são apresentados os resultados de mistura física das formulações selecionadas (RC e DC).

**Figura 34 -** Resultados dos termogramas dos (A) componentes das formulações (COL, AH, SF, P407, PSR e DPPA) e (B) *scaffolds* acelulares e mistura física (RC e DC) avaliados por



Nota: (A) COL - Colágeno bovino tipo I; AH - Ácido hialurônico; SF - Solução de fibroína da seda; P407 - Poloxamer 407; PSR - Polifenóis isolados do suco da romã em meio aquoso; DPPA - Difenil fosforil azida. (B) Formulação com PSR (RC) e formulação com DPPA (DC). Fonte: Elaboração própria.

Comparando os eventos térmicos da mistura física e dos *scaffolds* acelulares (Fig. 34-B), nos termogramas da mistura física (RC e DC) foram observados eventos térmicos que correspondem aos componentes das formulações (COL, AH, FS e P407), e isso ocorre devido a energia térmica fornecida pelo sistema fundir os componentes da formulação, e por isso causar uma interação entre si. Além disso, os termogramas da mistura física não apresentaram o evento térmico à 230 °C, que estão presentes nos termogramas dos *scaffolds* e são caracterizados como relaxamento das cadeias de COL, característico de uma extensão intermolecular da reticulação. Dessa forma, podemos indicar que houve uma interação e mistura miscível entre os componentes das formulações.

#### 14.7 Seleção dos scaffolds acelulares otimizados

De acordo com os resultados das propriedades mecânicas (Fig. 25 e Fig. 26), estudo de intumescimento (Fig. 27 e Fig. 28), estudo de desintegração (Fig. 29 e Fig. 30) e caracterização físico-química por FTIR (Fig. 31) e DSC (Fig. 33), foi possível selecionar as melhores formulações. As formulações selecionadas apresentam maior concentração de agentes reticulantes (PSR ou DPPA), sendo as formulações RC (0,03% de PSR) e DC (0,03% de DPPA). As formulações selecionadas para FTIR e DSC apresentaram interação entre os componentes usados para compor as formulações, e especificamente para DSC foi observado maior grau de reticulação, devido aumento da capacidade calorimétrica (ΔH), indicando aumento das ligações de hidrogênio. As propriedades mecânicas foram adequadas, com menor perfil de desintegração e intumescimento, confirmando os resultados observados no DSC. Desta forma, as amostras selecionadas (RC e DC) prosseguiram para as caracterizações morfológicas e morfométricas.

#### 14.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens microscópicas usando MEV permitiu analisar as características morfológica em diferentes magnificações (100x, 250x e 500x) da superfície dos *scaffolds* acelulares selecionados (RC e DC). Essas imagens estão apresentadas na Figura 35.



Figura 35 - Resultados das imagens microscópicas dos *scaffolds* acelulares (RC e DC) com magnificação de 100x, 250x e 500x avaliados por MEV

Nota: As formulações variaram pelo tipo de agente reticulante (PSR ou DPPA) na concentração de 0,03%, com PSR (RC) e com DPPA (DC). Fonte: Elaboração própria.

As formulações RC e DC (Fig. 35) apresentam estruturas porosas com arranjos regulares, contínuos e uniformes, distribuídos em sistemas de poros interligados. As formulações apresentaram uma faixa de tamanho de poros entre 99,54 e 138,4  $\mu$ m. Os valores dos sistemas de poros para formulação RC foi de 101,46±4,34  $\mu$ m, e na formulação DC foi de 123,58±21,01  $\mu$ m.

Porosidade é um parâmetro crucial para ser analisado na projeção de matrizes tridimensionais porosas. As matrizes devem fornecer um microambiente e arquitetura adequada para adesão, proliferação, diferenciação e organização celular. Dispositivos biomimético com porosidade ideal, adequada e específica ao tecido nativo podem atuar como veículos para as células, ocorrendo uma migração célula-dispositivo, promovendo o fornecimento de nutrientes e oxigênio. Assim, prevenindo a morte celular dependente de ancoragem (PINA *et al.*, 2019; MASSIMINO *et al.*, 2020).

#### 14.9 Características morfométricas

As características morfológicas e morfométricas do *scaffolds* acelulares selecionados (RC e DC) foram avaliadas por microtomografia computadorizada tridimensional ( $\mu$ CT). A  $\mu$ CT é uma análise não destrutiva, capaz de obter imagens tridimensionais de dispositivos porosos em escala micrométrica, que obtêm imagens digitais e fornecem dados quantitativos e qualitativos sobre a morfologia tridimensional do biomaterial analisado (MASSIMINO *et al.*, 2020). Os resultados das características morfológicas são apresentados na Figura 36 e na Tabela 10 os dados numéricos das características morfométricas.

Figura 36 - Resultados das características morfológicas dos *scaffolds* acelulares (RC e DC) avaliados por microtomografia computadorizada tridimensional



Nota: As formulações variaram pelo tipo de agente reticulante (PSR ou DPPA) na concentração de 0,03%, sendo com PSR (RC) e com DPPA (DC). As setas indicam as áreas de porosidade. Fonte: Elaboração própria.

Denêmetres evaliedes	Formulações			
rarametros avanados	RC	DC		
Interconectividade de poros (%)	76,55	76,74		
Volume de poros abertos (mm <sup>3</sup> )	6,55	8,01		
Poros fechados (%)	0,03	0,03		
Grau de anisotropia	0,79	0,80		

 Tabela 10 - Resultados numéricos das características morfométrica dos scaffolds acelulares (RC e

 DC) avaliados por microtomografia computadorizada tridimensional

Nota: As formulações variaram pelo tipo de agente reticulante (PSR ou DPPA) na concentração de 0,03%, sendo com PSR (RC) e com DPPA (DC).

Fonte: Elaboração própria.

De acordo com as características morfológicas (Fig. 36) foi possível observar a densidade entre as formulações RC e DC. As densidades foram evidenciadas nas regiões que apresentam coloração mais escuras, em tom de azul. Assim, na formulação RC foi possível evidenciar uma ligeira diferença, quando comparada com DC. Isso pode ser explicado pela diferença do agente reticulante usado, devido esse parâmetro de densidade estar relacionado diretamente ao grau de reticulação das formulações (SILVA *et al.*, 2014).

Os resultados numéricos das características morfométricas (Tab. 10) foram influenciados pelo tipo de agente reticulante usado nas formulações RC (PSR) e DC (DPPA). Contudo, os resultados para percentual de interconectividade de poros, volume de poros abertos, percentual de poros fechados e grau de anisotropia foram considerados satisfatório em ambas formulações.

Os resultados observados na Tab. 10 confirmam a porosidade observada na análise de MEV (Fig. 35). Além da porosidade, o grau de anisotropia é um parâmetro crítico para direcionar nova diferenciação de tecido (MULDER; BUMA; HANNINK, 2009). Esse parâmetro pode ser influenciado pela escolha do método. A obtenção de *scaffolds* por compressão de plástica seguida de liofilização, tem sido amplamente usada para dispositivos tridimensionais porosos. Os *scaffolds* acelulares fabricados por ultracongelamento, formam estruturas com sistemas de poros com orientação anisotrópica (ALVES *et al.*, 2019a).

O grau de anisotropia com valores próximos a zero, indicam estruturas isotrópicas, quando os valores estão próximos a 1, as amostras são estruturas anisotrópicas. Os *scaffolds* com características isotrópicas não apresentam relações estruturais e funcionais com o tecido nativo, mas quando têm características anisotrópicas, os *scaffolds* são fabricados com relação direta ao tecido nativo, com semelhanças estruturais hierárquicas de diversos tipos de células da MEC. Desse modo, o reparo tecidual com *scaffolds* anisotrópicos tendem a ser mais eficazes, por apresentarem arranjos arquitetônicos, anatomicamente mais semelhantes a morfologia celular e tecido nativo (MULDER; BUMA; HANNINK, 2009).

#### 15 CONCLUSÕES

As formulações nesse capítulo foram otimizadas pelo ajuste na concentração da fibroína e adição de agentes reticulantes de origem natural (PSR) ou química (DPPA). As formulações com PSR (RA-RC) e com DPPA (DA-DC) visualmente apresentaram colorações diferentes, características dos agentes reticulantes PSR (marrom) e DPPA (branco).

Nos espectros de FTIR e termogramas de DSC foi possível concluir, respectivamente, que houve interação química e mistura miscível entre os componentes usados para compor as formulações. Especificamente para RC e DC (compostas por 0,03% de agente reticulante) o aumento das ligações de hidrogênio foi responsável pela composição e maior grau de reticulação das formulações, resultando em maior estabilidade para o COL.

As propriedades mecânicas, capacidade de intumescimento e perfil de desintegração foram influenciado pelo tipo, variação de concentração dos agentes reticulantes (PSR ou DPPA) e característica estrutural dos *scaffolds*. As formulações RC e DC apresentaram os melhores resultados. Os *scaffolds* desenvolvidos foram caracterizados como matrizes tridimensionais porosas, onde sua porosidade foi confirmada pelas características morfométricas e morfológicas, usando a técnica de  $\mu$ CT e MEV.

Diante desses resultados podemos concluir que as formulações selecionadas (RC e DC) apresentaram potencial para associação com CLL (Cap. II) para promover a funcionalização dos *scaffold* acelular com aplicação no tecido cardíaco lesionado para promover recuperação funcional.

## CAPÍTULO V

### 16 ASSOCIAÇÃO DE CRISTAL LÍQUIDO LIOTRÓPICO COM *SCAFFOLD* ACELULAR PARA APLICAÇÃO NO TECIDO CARDÍACO

#### 16.1 Resumo gráfico



Nota: FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier; DSC - Calorimetria exploratória diferencial;  $\mu$ CT - Microtromografia computadorizada tridimensional; MEV - Microscopia eletrônica de varredura.

Fonte: Elaboração própria.

#### 16.2 Introdução

As doenças cardiovasculares têm se apresentado como as principais causas de morte ou morbidade. Após lesões significativas no tecido com potencial regenerativo limitado, como as ocorridas pós-infarto do miocárdio, ocorre uma substituição do tecido contrátil por uma cicatriz fibrótica, que não contribui para função de bombeamento cardíaco, e assim prejudicando na qualidade e tempo de vida devido à falha cardíaca (CHAUD *et al.*, 2017).

Os *scaffolds* tem sido usado como terapia acelular para recuperação funcional do tecido cardíaco. A sua composição química, propriedades mecânicas e arquitetura tridimensional, desempenham características primordiais para a interação entre a célula e microambiente. Esse microambiente é propício para guiar o alinhamento dos cardiomiócitos e promover a maturação, induzindo o desenvolvimento de um fenótipo contrátil e eletromecânico com o tecido lesionado (hospedeiro) (ARNAL-PASTOR *et al.*, 2013).

Contudo na aplicação dos *scaffolds* para o tecido cardíaco, um dos maiores desafios na projeção desse biomaterial está relacionada com a condutividade dos estímulos elétricos. Assim, o desenvolvimento desses biomateriais tem como requisito a capacidade de suportar, a condução e propagação de estímulos elétricos nos cardiomiócitos adjacentes, onde o *scaffold* é aplicado. Nesta linha de raciocínio, os *scaffolds* tem sido funcionalizados por sistemas ou polímeros com ação condutora (ALVES *et al.*, 2019b; BORRIELLO *et al.*, 2011).

Nesse estudo o objetivo foi desenvolver *scaffold* funcionalizado com CLL (*Scaffold*-CLL) para aplicação no tecido cardíaco lesionado. O *Scaffold*-CLL foram caracterizados por propriedades mecânicas usando texturômetro, estudo de intumescimento e desintegração usando estufa com circulação e renovação de ar, estudo de condutividade elétrica usando condutivímetro, avaliação físico-química por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e calorimetria exploratória diferencial, avaliação morfológica usando microscopia eletrônica de varredura e avaliação morfológica e estrutural usando microtomografia computadorizada tridimensional.

#### 16.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental desse estudo foi realizado em escala laboratorial, no Laboratório de biomateriais e nanotecnologia da Universidade de Sorocaba (LaBNUS). De acordo com os resultados obtidos no Cap. II (CLL) e Cap. V (*scaffold* acelular otimizado), as melhores formulações foram selecionadas para promover a associação dos sistemas complexos. Para o desenvolvimento desse estudo, a obtenção, seleção e caracterização dos *Scaffold*-CLL estão apresentados esquematicamente na Figura 37.

Associação de cristal líquido liotrópico com scaffold acelular (Scaffold-CLL) - Colágeno bovino tipo I (COL)
- Ácido hialurônico (AH)
- Solução de fibroina da seda (FS)
- Poloxamer 407% (P407)
- Politêndis isolados do suco da
romã (*Punica granatum L.*) (PSR)
- Difenil fosforil azida (DPPA)
- Cristal líquido liotrópico (CLL) - Folitêndis de fibroine da seda (FS)
- Difenil fosforil azida (DPPA)
- Cristal líquido liotrópico (CLL) - Solução de fibroine da seda (FSR)
- Difenil fosforil azida (DPPA)
- Cristal líquido liotrópico (CLL) - Solução de fibroine da seda (FSR)
- Difenil fosforil azida (DPPA)
- Cristal líquido liotrópico (CLL) - Solução de fibroine da seda (FSR)
- Difenil fosforil azida (DPPA)
- Cristal líquido liotrópico (CLL) - Solução de sintegração
- Estudo de condutividade elétrica
- FTIR
- DSC
- µCT
- MEV

Figura 37 - Fluxograma esquemático da obtenção, caracterização e seleção dos Scaffold-CLL

Nota: FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier; DSC - Calorimetria exploratória diferencial;  $\mu$ CT - Microtromografia computadorizada tridimensional; MEV - Microscopia eletrônica de varredura.

Fonte: Elaboração própria.

#### 17 MATERIAL E MÉTODOS

#### 17.1 Material

Monoleína 18-92 (Myverol 18-92K. Kerry, Lote: 2017539, Wisconsin, EUA), monoleína 18-99 (Myverol 18-99K. Kerry, Lote: 1806600148, Wisconsin, EUA), Poloxamer

407<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, Lote: BCBQ6661V, Saint Louis, USA), Colágeno bovino tipo I cedido pela Novaprom Food Ingredients. Especificações físico-químicas: proteína (N x 6.25) > 98%, umidade < 12%, gordura < 3%, cinzas < 5% e pH (sol. a 12,5%) 6 a 8. (Lote: 112520170531, Lins, SP, Brasil), ácido hialurônico 1% (Bioproducts, Lote: 110061, São Paulo, SP, Brasil), fibroína da seda (*Bombyx mori*) (os casulos do bicho-da-seda foram usados para extrair a solução de fibroína da seda), difenil fosforil azida 97% (Sigma-Aldrich, Lote: MKBZ0923V, Saint Louis, EUA), polifenóis isolados do suco da romã (*Punica granatum L*.) em meio aquoso (fruto colhido em Sorocaba, São Paulo, Brasil), água ultrapura (18,2 MΩ.cm<sup>-1</sup>) e os demais reagentes foram de grau analítico.

#### 17.2 Métodos

#### 17.2.1 Preparação e obtenção dos Scaffold-CLL

O desenvolvimento dos *Scaffold*-CLL envolveu duas etapas (i) preparação de hidrogel e (ii) compressão plástica. Resumidamente, a preparação de hidrogel consistiu na dispersão das formulações de CLL (DT1-F6, DT1-F21 e DT2-F21), colágeno bovino tipo I (COL), ácido hialurônico (AH), solução de fibroína da seda (SF), poloxamer 407<sup>®</sup> (P407) e os agentes reticulantes (PSR ou DPPA) em água ultrapura (m/v). Essa dispersão foi agitada manualmente até obter uma mistura homogênea e o pH foi ajustado para 10, usando NaOH 2M. Após esse processo, a dispersão foi colocada em recipiente cilíndrico com capacidade volumétrica de 10 mL (diâmetro e altura de 20 mm) e mantida em refrigerador à 10±1 °C durante 24 horas para promover reticulação.

A compressão plástica do hidrogel foi realizada com prensa hidráulica, aplicando uma força de compressão estática (de cima pra baixo) de 4 KN durante 10 minutos, de acordo com a técnica descrita por Alves et al., (2018). Após essa compressão, as formulações foram ultracongeladas à -80 °C e liofilizadas por 24 horas. Nesse estudo foram obtidas seis diferentes formulações, variando pelo tipo de agente reticulante (PSR ou DPPA) e formulação de CLL (DT1-F6, DT1-F21 e DT2-F21). Assim, as formulações com PSR foram identificadas como RC-DT1-F6, RC-DT1-F21 e RC-DT2-F21. As formulações com DPPA foram denominadas como DC-DT1-F6, DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21. Essas formulações estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Composição das formulações dos Scaffold-CLL						
	Formulações					
Composição (m/v)	RC-	RC-	RC-	DC-	DC-	DC-
	<b>DT1-F6</b>	DT1-F21	DT2-F21	DT1-F6	DT1-F21	DT2-F21
COL	5,0 g	5,0 g	5,0 g	5,0 g	5,0 g	5,0 g
AH 1%	0,18 g	0,18 g	0,18 g	0,18 g	0,18 g	0,18 g
FS 3%	0,80 g	0,80 g	0,80 g	0,80 g	0,80 g	0,80 g
P407	0,04 g	0,04 g	0,04 g	0,04 g	0,04 g	0,04 g
PSR	0,024 g	0,024 g	0,024 g	-	-	-
DPPA 97%	-	-	-	0,024 g	0,024 g	0,024 g
CLL	2,5 g	2,5 g	2,5 g	2,5 g	2,5 g	2,5 g
Áqua ultranura asn	71 46 mI	71 46 mI	71 46 mL	71 46 mL	71 46 mL	71 46 mI

Água ultrapura qsp. 71,46 mL Nota: COL - Colágeno bovino tipo I; AH - Ácido hialurônico; FS - Solução de fibroína da seda; P407 - Poloxamer 407<sup>®</sup>; PSR - Polifenóis isolados do suco da romã em meio aquoso; DPPA - Difenil fosforil azida; CLL - Cristal líquido liotrópico.

Fonte: Elaboração própria.

#### **17.2.2 Propriedades mecânicas**

As propriedades mecânicas dos *Scaffold*-CLL foram avaliadas por texturômetro. A análise foi realizada como descrito no item 9.2.3 (Propriedades mecânicas - Capítulo III).

#### 17.2.3 Estudo de intumescimento

O estudo de intumescimento foi realizado para avaliar a capacidade de intumescimento da estrutura completa dos *Scaffold*-CLL (matriz e sistema de poros) (A) e medida da capacidade de intumescimento do próprio material (matriz) (B). Essa análise foi realizada como descrito no item 9.2.9 (Estudo de intumescimento - Capítulo III).

#### 17.2.4 Estudo de desintegração

O estudo de desintegração foi usado para avaliar o perfil de desintegração e resistência dos *Scaffold*-CLL Essa análise foi realizada como descrito no item 9.2.8 (Estudo de desintegração - Capítulo III).

#### 17.2.5 Estudo de condutividade elétrica

O estudo de condutividade elétrica foi realizado como descrito por Fonseca et al., (2019) e Wang et al., (2017), com modificações. No ensaio o medidor de condutividade (MS Tecnopon Instrumentação, mCA-150P, Piracicaba, SP, Brasil) foi previamente calibrado com solução padrão de 146,9  $\mu$ S/cm (Lote: 7310720, MS Tecnopon Instrumentação). Resumidamente, as amostras (1 cm<sup>2</sup>) dos *Scaffold*-CLL, em triplicata, foram imersas em 10

mL de água ultrapura à 23±2 °C (temperatura ambiente). A condutividade elétrica foi medida em 2, 20, 40 e 60 minutos para avaliar capacidade e perfil de condução elétrica das formulações (*Scaffolds*-CLL). Os resultados foram expressos em S/cm.

#### 17.2.6 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi usada para determinar os grupamentos químicos dos componentes das formulações (COL, AH, SF, P407, PSR, DPPA e CLL) e *Scaffold*-CLL. A caracterização foi realizada conforme descrito no item 5.2.4 (Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) - Capítulo II).

#### 17.2.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização termoanalítica dos componentes das formulações (COL, AH, SF, P407, PSR, DPPA e CLL) e *Scaffold*-CLL foram obtidas usando DSC. A análise foi realizada conforme descrito no item 5.2.5 (Calorimetria exploratória diferencial (DSC) - Capítulo II).

#### 17.2.8 Características morfométricas

As características morfométricas dos *Scaffold*-CLL foram avaliados µCT. As análises foram realizadas como descritas no item 9.2.4 (Características morfométricas - Capítulo III).

#### 17.2.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens das superfícies dos *Scaffold*-CLL foram obtidas por MEV, com magnificação de 100x, 250x e 500x. A análise foi realizada como descrito no item 9.2.5 (Microscopia eletrônica de varredura (MEV) - Capítulo III).

#### 17.2.10 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas usando a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey para comparação entre as médias, com intervalo de confiança de 95%. O valor de P <0,05 foi considerado significativo.

#### **18 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 18.1 Obtenção do scaffold funcionalizado

O *Scaffold*-CLL foram obtidos pela associação dos sistemas complexos, sendo CLL (Cap. II) e *Scaffold* acelular otimizado (Cap. V), obtidos e selecionados em estudos anteriores. Como descrito no Cap. III, o *Scaffold*-CLL foram preparados seguindo as três etapas de desenvolvimento, sendo dispersão dos componentes das formulações em meio aquoso para obtenção de hidrogel, compressão plástica de hidrogel seguida por ultracongelamento e liofilização. Assim, o método empregado permitiu obter o *Scaffold*-CLL, com aspecto uniforme, regular e estável. Na Figura 38 estão apresentadas as amostras de (A) hidrogel e (B) *Scaffold*-CLL.





Nota: (A) Hidrogel; (B) *Scaffold*. As formulações variaram pelo tipo de agente reticulante (PSR ou DPPA) na concentração de 0,03%, variando as formulações de CLL (DT1-F6, DT1-F21, DT2-F21). Formulações: A1-B1 (RC-DT1-F6); A2-B2 (RC-DT1-F21); A3-B3 (RC-DT2-F6); A4-B4 (DC-DT1-F6); A5-B5 (DC-DT1-F21) e A6-B6 (DC-DT2-F21). Fonte: Elaboração própria.

#### 18.2 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas (perfuração, resiliência, flexibilidade, tração e módulo elástico) do *Scaffold*-CLL foram avaliadas pelo texturômetro. Essa caracterização é considerada crucial no desenvolvimento dos dispositivos biomédicos, pois os *scaffolds* devem apresentar resistência mecânica apropriada e superfície bioativa adequada para o rápido reparo e recuperação dos tecidos (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011). Essas propriedades estão diretamente relacionadas com a resistência e capacidade estrutural dos biomateriais, que podem sofrer deformações reversíveis ou irreversíveis influenciadas pela aplicação de uma força mecânica externa (MANO, 1991).

Nesse estudo as propriedades mecânicas (perfuração, resiliência, flexibilidade, tração e módulo elástico) do *Scaffold*-CLL avaliou a influência dos agentes reticulantes (PSR ou DPPA) associados com as formulações de CLL (DT1-F6, DT1-F21 e DT2-F21). Contudo, a formulação de *Scaffold*-CLL obtido com DT1-F6, tanto para formulações reticuladas com PSR (RC) e DPPA (DC) foram excluídas do estudo, devido após hidratação de 60 minutos em meio aquoso, as formulações se desintegrarem completamente. Esse fenômeno ocorrido com RC-DT1-F6 e DC-DT1-F6 pode ser explicado pelo baixo grau de reticulação, influenciado pela composição das formulações de CLL.

Quando comparada as formulações de CLL (DT1-F6, DT1-F21 e DT2-F21), todas as formulações foram compostas por 10% de monoleína. Para fase aquosa e hidrótropo, as formulações foram inversamente proporcionais, sendo a DT1-F6 composta por 60% de fase aquosa e 30% de hidrótropo, diferente das DT1-F21 ou DT2-F21 que foram compostas por 30% de fase aquosa e 60% de hidrótropo. Portanto, indicando que a menor concentração de fase aquosa (30%) e maior concentração de hidrótropo (60%) forneceu melhor arranjo e organização entre as nanopartículas de CLL e os polímeros, promovendo maior grau de reticulação nas formulações obtidas com DT1-F21 e DT2-F21. Desta forma, os resultados das propriedades mecânicas (perfuração, resiliência, flexibilidade, tração e módulo elástico) dos *Scaffold-CLL* avaliados por texturômetro estão apresentados na Figura 39.



Figura 39 - Resultados das propriedades mecânicas dos Scaffold-CLL

Nota: As formulações variaram pelo tipo de agente reticulante RC (0,03% de PSR) e DC (0,03% de PSR) e formulação de CLL (DT1-F21 ou DT2-F21). (\*) Significa que há diferença estatística na mesma análise (p<0,05). (\*\*) Significa que não há diferença estatística na mesma análise (p>0,05) (n = 3). Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a Fig. 39, para perfuração as formulações RC-DT1-F21 e DC-DT1-F21 foram estatisticamente semelhantes (p>0,05), e RC-DT2-F21 e DC-DT2-F21 foram estatisticamente diferentes (p<0,05). A maior resistência à perfuração foi observada para RC-
DT2-F21 (0,780±0,068 N). Para resiliência, as RC-DT1-F21 e RC-DT2-F21 apresentaram diferenças significativas (p<0,05), e para DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21 não foram observadas diferenças estatísticas (p>0,05). A formulação mais resiliente foi RC-DT2-F21 (0,494±0,011 N). Em flexibilidade, as formulações RC-DT1-F21, DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21 foram estatisticamente semelhantes (p>0,05), sendo RC-DT2-F21 estatisticamente diferente (p<0,05). A formulação RC-DT2-F21 (0,306±0,010 N) foi considerada mais flexível.

Para tração, RC-DT1-F21, DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21 foram estatisticamente semelhantes (p>0,05), e as formulações RC-DT2-F21 foram estatisticamente semelhantes com DC-DT1-F21 (p>0,05). A maior resistência à tração foi observado em RC-DT2-F21 (0,453±0,116 N). No módulo elástico, as formulações RC-DT1-F21 e RC-DT2-F21 foram estatisticamente semelhantes (p>0,05), e DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21 não apresentaram diferenças estatísticas (p>0,05). As formulações com PSR (RC) apresentaram maior rigidez, sendo RC-DT1-F21 (5,27±0,10 KPa) e RC-DT1-F21 (5,23±0,13 KPa). Esses resultados sugerem que o tipo de agente reticulante (PSR ou DPPA) e monoleína (MO-18-92 ou MO-18-99) usados nas amostras influenciaram nos resultados das propriedades mecânicas do *Scaffold*-CLL.

A elasticidade é parâmetro importante para ser analisada no processo de desenvolvimento de *scaffolds a*plicado no reparo e recuperação funcional do tecido cardíaco. De acordo com a literatura, a elasticidade do músculo estriado é aproximadamente 10 KPa, podendo variar até 20 KPa. Após infarto do miocárdio, a cicatriz fibrótica aumenta a rigidez do tecido cardíaco apresentando elasticidade entre 35-70 KPa (BERRY *et al.*, 2006; ENGLER *et al.*, 2008; SERPOOSHAN *et al.*, 2013).

Nesse estudo os *scaffolds* exibiram módulo elástico entre 4,5-5,0 KPa, essa faixa foi considerada adequada, devido alcançar a faixa de contratilidade máxima de cardiomiócitos e desenvolvimento de cardiomiócitos imaturos (1-14 KPa) (ENGLER *et al.*, 2008; SERPOOSHAN *et al.*, 2013). Os *scaffolds* altamente rígidos dificultam as propriedades contráteis das células cardíacas, desta forma quando são relativamente elásticos podem apresentar benefícios para fornecer um microambiente *scaffold*-tecido cardíaco lesionado.

# 18.3 Estudo de intumescimento

O estudo de intumescimento foi usado para avaliar a capacidade de intumescimento do *Scaffold*-CLL em tampão de fosfato com pH (7,4 à 37±2 °C), durante 120 horas com intervalo de 24 horas. Essa capacidade foi analisada por absorção do fluído pela estrutura completa

(matriz e sistema de poros) e pelo próprio material (matriz) dos *scaffolds*. Todas as formulações apresentaram capacidade de intumescimento, no entanto, as diferenças foram observadas de acordo com tipo de agente reticulante (PSR ou DPPA) e monoleína (MO-18-92 ou MO-18-99) usados. Os resultados da capacidade de intumescimento da estrutura completa (A) e do próprio material (B) do *Scaffold*-CLL estão apresentados na Figura 40.





Nota: As formulações variaram pelo tipo de agente reticulante RC (0,03% de PSR) e DC (0,03% de PSR) e formulação de CLL (DT1-F21 ou DT2-F21). (\*) Significa que há diferença estatística na mesma análise (p<0,05). (\*\*) Significa que não há diferença estatística na mesma análise (p>0,05) (n = 3). Fonte: Elaboração própria.

O estudo de intumescimento (Fig. 40) houve um aumento gradativo na capacidade de intumescimento para RC-DT1-F21 e DC-DT1-F21 até 72 horas, e para RC-DT2-F21 e DC-DT2-F21 até 96 horas. De acordo com a Fig. 41-A, a capacidade de intumescimento da estrutura completa (matriz e sistema de poros) do *Scaffold*-CLL variou entre 495 e 968%. Nos tempos de 24, 48 e 96 horas, as formulações foram estatisticamente diferentes (p<0,05). Para o tempo de 72 horas, as formulações RC-DT1-F21 e RC-DT2-F21 foram estatisticamente semelhantes (p>0,05), porém, DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21 apresentaram diferenças estatísticas (p<0,05). O máximo grau de intumescimento para RC-DT1-F21 (968,99±6,39) e DC-DT2-F21 (808,38±20,38) foram observados em 72 horas, RC-DT2-F21 (960,62±16,85) em 96 horas e para DC-DT1-F21 (740,73±29,49) em 48 horas.

De acordo com a Fig. 40-B, a capacidade de intumescimento do próprio material (matriz) do *Scaffold*-CLL variou entre 402 e 868%. No tempo de 24 horas, RC-DT2-F21, DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21 não apresentaram diferenças estatísticas (p>0,05), porém, RC-DT1-F21 foi estatisticamente diferente (p<0,05). Para 48 horas, as formulações RC-DT1-F21 e DC-DT2-F21 foram estaticamente diferentes, e as RC-DT2-F21 e DC-DT1-F21 foram estatisticamente semelhantes (p>0,05). No tempo de 72 e 96 horas, as formulações foram

estatisticamente diferentes (p<0,05). O máximo grau de intumescimento para RC-DT1-F21 (524,04±14,36) e DC-DT2-F21 (617,40±25,47) foram observados em 72 horas, RC-DT2-F21 (868,97±20,64) foi observado em 96 horas e para DC-DT1-F21 (712,59±26,77) em 48 horas.

Quando comparados os resultados das formulações RC e DC com as formulações de CLL (DT1-F21 ou DT2-F21), o perfil de intumescimento foi influenciado pelo o tipo de agente reticulante (PSR ou DPPA) e monoleína (MO-18-92 ou MO-18-99) usados. A reticulação é considerada um parâmetro importante na redução ou absorção de fluídos no Scaffold-CLL, ou seja, quando ocorre aumento no grau de reticulação, há uma diminuição da capacidade de intumescimento. Desse modo, o menor perfil de capacidade de intumescimento reflete na alta densidade de reticulação, resultando em menor flexibilidade e redução do volume livre entre as cadeias poliméricas (TRIFKOVIĆ et al., 2015; YANG; RITCHIE; EVERITT, 2017).

## 18.4 Estudo de desintegração

A perda de massa foi usada para avaliar o perfil de desintegração e a resistência do Scaffold-CLL em tampão de fosfato com pH (7,4 à 37±2 °C), durante 120 horas com intervalo de 24 horas. O estudo de desintegração é um fenômeno complexo, dependente de fatores intrínsecos dos scaffolds como propriedades morfológicas e topográfica, diâmetro, estrutura e percentual de poros, grau de anisotropia, tipo e grau de reticulação e hidrofilicidade (ALVES et al., 2019b; MARTÍNEZ et al., 2015). Os resultados do perfil de desintegração do Scaffold-CLL (A) e as medidas de pH (B) estão apresentados na Figura 41.



Figura 41 - Resultados do (A) perfil de desintegração e (B) medidas de pH no estudo de desintegração

Nota: As formulações variaram pelo tipo de agente reticulante RC (0,03% de PSR) e DC (0,03% de PSR) e formulação de CLL (DT1-F21 ou DT2-F21). (\*) Significa que há diferença estatística na mesma análise (p<0,05). (\*\*) Significa que não há diferença estatística na mesma análise (p>0,05) (n = 3). Fonte: Elaboração própria.

No estudo de desintegração (Fig. 41) houve um aumento gradativo de perda de massa até 72 horas para as amostras RC-DT1-F21 e DC-DT1-F21, e para RC-DT2-F21 e DC-DT2-F21 até 96 horas. De acordo com Fig. 40-A, o perfil de desintegração e perda de massa do *Scaffold*-CLL variou entre 15,98 e 44,52%. No tempo de 24 e 48 horas (Fig. 41-A), as formulações RC-DT1-F21 e RC-DT2-F21 apresentaram diferença estatística (p<0,05), porém, as formulações DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21 foram semelhantes com as RC-DT1-F21 e RC-DT2-F21 (p>0,05).

No tempo de 72 horas, as formulações RC-DT1-F21 e DC-DT1-F21; RC-DT2-F21 e DC-DT2-F21, entre si foram consideradas semelhantes (p>0,05). Para o tempo de 96 horas, as formulações RC-DT2-F21 e DC-DT2-F21 não apresentaram diferenças estatísticas (p>0,05). Após 72 horas, a perda de massa de RC-DT1-F21 foi 38,59±5,73% e para DC-DT1-F21 foi 44,52±6,37%. Após 96 horas, a perda de massa para RC-DT2-F21 foi 34,38±5,73% e de DC-DT2-F21 foi 30,33±4,00%.

Comparando os resultados das formulações RC e DC com as formulações de CLL (DT1-F21 ou DT2-F21), o perfil de desintegração e perda de massa foi influenciado pelo o tipo de agente reticulante (PSR ou DPPA) e monoleína (MO-18-92 ou MO-18-99) usados. Os *scaffolds* que não apresentam reticulação adequada, consequentemente apresentam maiores perda de massa, resultando em completa desintegração. A reticulação é um parâmetro importante na projeção dos *scaffolds* aplicados na bioengenharia de tecidos, que refletem na diminuição do tempo de desintegração, garantindo a integridade estrutural e maior controle de perda de massa. Os *scaffolds* que apresentam resistência na desintegração possuem capacidade para ancoragem, adesão, proliferação e diferenciação celular no tecido cardíaco, bem como, também influenciam na sustentação mecânica dos ciclos de bombeamento cardíaco (GROVER; CAMERON; BEST, 2012).

De acordo com Fig. 41-B, as medidas de pH do *Scaffold*-CLL variou entre 7,33 e 7,71. No tempo de 24 horas, as formulações RC-DT1-F21 e RC-DT2-F21; DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21, entre si foram consideradas semelhantes (p>0,05). Para 48 e 72 horas, RC-DT1-F21 e DC-DT2-F21 foram consideradas com diferença estatística (p<0,05), e as DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21 foram consideradas semelhantes (p>0,05). Em 96 horas, RC-DT2-F21 e DC-DT2-F21 apresentaram diferenças estatísticas (p<0,05). As medidas de pH após 72 horas de RC-DT1-F21 foi 7,54±0,01, para DC-DT1-F21 foi 7,50±0,01. Após 96 horas para RC-DT2-F21 foi 7,58±0,03 e de DC-DT2-F21 foi 7,71±0,02. O acompanhamento do pH durante estudo de desintegração é um parâmetro crítico, devido as alterações bruscas do pH causar alterações ou morte celular. Analisando os resultados de pH não houve alterações significativas influenciadas pela degradação hidrolítica.

## 18.5 Estudo de condutividade elétrica

O estudo de condutividade elétrica foi realizado por condutivímetro para avaliar a capacidade de condução elétrica do *Scaffold*-CLL em função do tempo. Os resultados da condutividade elétrica do *Scaffold*-CLL são apresentados na Figura 42. A condutividade mede a condução elétrica dos biomateriais, determinando a capacidade de um material conduzir corrente elétrica. Os biomateriais que apresentam condutividade menor que 10<sup>-8</sup> S/cm são considerados isolantes, os biomateriais com condutividade entre 10<sup>-8</sup> e 10<sup>-3</sup> S/cm são classificados como semicondutores, e os que apresentam valores maiores que 10<sup>-3</sup> S/cm são biomateriais condutores (BORRIELLO et al., 2011).





Nota: As formulações variaram pelo tipo de agente reticulante RC (0,03% de PSR) e DC (0,03% de PSR) e formulação de CLL (DT1-F21 ou DT2-F21). Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a Fig. 42, o tipo de agente reticulante (PSR ou DPPA) e as formulação de CLL (DT1-F21 e DT2-F21) influenciaram na capacidade de condutividade elétrica das formulações. Como observado nos resultados, a tendência da condutividade é aumentar em função do tempo. No tempo de 2 minutos, não houve diferença estatística para RC-DT1-F21, RC-DT2-F21 e DC-DT1-F21 (p>0,05), porém, para DC-DT2-F21 houve diferença (p<0,05). No tempo de 20 e 40 minutos, as formulações RC-DT1-F21 e DC-DT2-F21 foram estatísticamente semelhantes (p>0,05), e para RC-DT2-F21 e DC-DT1-F21 houve diferença estatística (p<0,05).

Em 60 minutos, as formulações RC-DT1-F21, DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21 foram estatisticamente semelhantes (p>0,05), havendo diferença estatística apenas para RC-DT2-F21. Após 60 minutos, os valores de condutividade para RC-DT1-F21, RC-DT2-F21, DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21 foram, respectivamente,  $6,2.10^{-5} \pm 0,12.10^{-5}$  S/cm,  $6,6.10^{-5} \pm 0,025.10^{-5}$  S/cm,  $6,0.10^{-5} \pm 0,026.10^{-5}$  S/cm e  $5,9.10^{-5} \pm 0,12.10^{-5}$  S/cm. Assim, os resultados das formulações se apresentaram na ordem de  $10^{-5}$  S/cm.

Na medicina regenerativa um dos principais requisitos e desafio na projeção de *scaffolds* aplicado para reparo e recuperação funcional do tecido cardíaco, consiste no potencial de condução e propagação de estímulos mioelétricos. Em nosso estudo a estratégia de associar os CLL aos *scaffolds*, teve por finalidade permitir que os CLL promovessem o potencial de indução do estímulo mioelétrico, usando alternativas biomiméticas. Assim, os resultados obtidos no estudo de condutividade, indica que a associação dos sistemas complexos (CLL e *scaffolds*) foi satisfatória, sendo considerados semicondutores.

Segundo Baheiraei *et al.*, (2014), o acoplamento eletromecânico dos cardiomiócitos é um fator crucial para o estímulo elétrico simultâneo. Desta forma, quando há baixa condutividade pode limitar a capacidade de contração efetiva. Quando *scaffold* possui característica semicondutora pode facilitar na propagação dos sinais elétricos, resultando na contração e auxiliar no direcionamento da proliferação e diferenciação das células mesenquimais e cardiomiócitos (BORRIELLO *et al.*, 2011).

Os batimentos cardíacos são resultados de respostas mecânicas coordenadas pelos sinais elétricos, que percorrem no tecido cardíaco, sendo mediado por efluxo iônico das membranas celulares. Quando ocorre uma lesão no tecido cardíaco como infarto do miocárdio, essa área infartada é substituída por um tecido de cicatrização que impede a função contrátil, que por sua vez, não contribui no bombeamento cardíaco, prejudicando não só a qualidade de vida, mas também reduzindo seu o tempo de vida devido à falha cardíaca (SHAPIRA; FEINER; DVIR, 2016; CHAUD *et al.*, 2017).

## 18.6 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR foi usado para analisar os grupamentos químicos característicos e as interações entre os componentes das formulações e *Scaffold*-CLL, utilizando FTIR no modo de transmitância. A Figura 43 apresenta os resultados dos espectros no infravermelho dos componentes das formulações (COL, AH, SF, P407, PSR e DPPA, DT1-F21 e DT2-F21)

(Fig. 43-A) e *Scaffold*-CLL (RC-DT1-F21, RC-DT2-F21, DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21) (Fig. 43-B).



Figura 43 - Resultados dos espectros dos (A) componentes das formulações e (B) *Scaffolds-CLL* avaliados por FTIR

Nota: (A) COL - Colágeno bovino tipo I; AH - Ácido hialurônico; SF - Solução de fibroína da seda; P407 - Poloxamer 407; PSR - Polifenóis isolados do suco da romã em meio aquoso; DPPA - Difenil fosforil azida; Formulações de CLL (DT1-F21 e DT2-F21). (B) As formulações variaram pelo tipo de agente reticulante RC (0,03% de PSR) ou DC (0,03% de PSR) e formulação de CLL (DT1-F21 ou DT2-F21). Fonte: Elaboração própria.

Nos espectros de infravermelho dos componentes das formulações (Fig. 43-A), para COL foram observados estiramentos do grupo hidroxila (-OH) em 3.450 cm<sup>-1</sup> e vibrações de CH<sub>3</sub> em 2.850 cm<sup>-1</sup>. Em 1.635 cm<sup>-1</sup> foi observado o pico correspondente a amida I, referente a absorção que surge principalmente no estiramento de C=O. A banda correspondente de amida II (N-H) e grupo C-N foi observado em 1.527 cm<sup>-1</sup>. Em 1.240 cm<sup>-1</sup> foi descrito como estiramento de amida III. Em 1.448 cm<sup>-1</sup> e entre a região 1.417-1.360 cm<sup>-1</sup> foram correspondentes a estereoquímica dos anéis de pirrolidina de prolina e hidroxiprolina (LEÓN-MANCILLA *et al.*, 2016; ALVES *et al.*, 2018).

No espectro de AH foram observadas bandas entre 3.200-3.650 cm<sup>-1</sup>, correspondente ao grupamento hidroxila. A banda entre 1.630-1.680 cm<sup>-1</sup> foram descritos como estiramentos de amida (-CO-NH) e o na região de 1.000-1.300 cm<sup>-1</sup> correspondem ao grupo carbonila (C=O) (LIM et al., 2011; YU et al., 2013). Nos espectros de FS (Fig. 47-A) as bandas descritas por amida I, amida II e amida III foram observadas, respectivamente, em 1.643 cm<sup>-1</sup>, 1.527 cm<sup>-1</sup> e 1.238 cm<sup>-1</sup> (ALVES; ARANHA; CHAUD, 2018).

Nos espectros de P407 em 3.500 cm<sup>-1</sup> e 2.889 cm<sup>-1</sup> foram observados estiramentos de, respectivamente, -OH e C-H alifático. As vibrações de C-O foram apresentadas em 1.469 cm<sup>-1</sup> e 1.109 cm<sup>-1</sup> (JINDAL; MEHTA, 2015; LIU et al., 2017; WANG *et al.*, 2006). No espectro de PSR (Fig. 47-A) foram observados duas bandas características da romã (*Punica granatum*)

*L*.), em 3.421 cm<sup>-1</sup> o grupo hidroxila e em 1.651 cm<sup>-1</sup> foi relacionado ao C=C, sendo as vibração de estiramento dos anéis de benzeno (EDISON; SETHURAMAN, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Na literatura não foram encontrados estudos que descrevem os espectros de DPPA puro, no entanto, devido sua composição química sugere que em 2.170 cm<sup>-1</sup> correspondem as vibrações de nitrogênio (N<sub>3</sub>) (BENKADDOUR et al., 2013), os estiramentos na região entre 1.400-1.600 cm<sup>-1</sup> foram referentes as vibrações de C=C, sendo característica dos anéis aromáticos (OLIVEIRA et al., 2016). Em 1.010 cm<sup>-1</sup> foi observado como ligações de C-O (COLDEA et al., 2013), e entre 600-1.110 cm<sup>-1</sup> como grupo fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), podendo ser apresentado na forma simétrica ou assimétrica (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Nos espectros das formulações de CLL, em DT1-F21 foram observados bandas correspondentes ao grupo -OH, vibração de  $CH_2$ , grupo carbonila e vibrações de ligação do grupo C-O, respectivamente, em 3.462 cm<sup>-1</sup>, 2.920 cm<sup>-1</sup>, 1.651 cm<sup>-1</sup> e 1.095 cm<sup>-1</sup>. Na formulação DT2-F21 apresentou bandas descrita como -OH em 3.445 cm<sup>-1</sup>, em 2.922 cm<sup>-1</sup> foi observado as vibrações de  $CH_2$ , o grupo carbonila em 1.649 cm<sup>-1</sup> e estiramento correspondente ao C-O foi observado em 1.093 cm<sup>-1</sup>.

Nos espectros dos *Scaffolds-CLL* (Fig. 43-B), todas as formulações (RC-DT1-F21, RC-DT2-F21, DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21) exibiram bandas e estiramentos característicos dos componentes usados na composição das formulações, desta forma, os resultados indicam que houve uma mistura e interação química entre os componentes das formulações.

# 18.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A avaliação termoanalítica permitiu identificar as mudanças nas transformações físicoquímicas influenciadas pelo aquecimento nos componentes das formulações (COL, AH, SF, P407, PSR, DPPA, DT1-F21 e DT2-F21) e do *Scaffold-CLL* (RC-DT1-F21, RC-DT2-F21, DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21). Essa análise foi realizada usando DSC, os resultados dos termogramas estão apresentados na Figura 44 para componentes das formulações (Fig. 44-A) e *Scaffold-*CLL (Fig. 44-B).



Figura 44 - Resultados dos termogramas dos (A) componentes das formulações e (B) Scaffold-CLL

Nota: (A) COL - Colágeno bovino tipo I; AH - Ácido hialurônico; SF - Solução de fibroína da seda; P407 -Poloxamer 407; PSR - Polifenóis isolados do suco da romã em meio aquoso; DPPA - Difenil fosforil azida; Formulações de CLL (DT1-F21 e DT2-F21). (B) As formulações variaram pelo tipo de agente reticulante RC (0,03% de PSR) ou DC (0,03% de PSR) e formulação de CLL (DT1-F21 ou DT2-F21). Fonte: Elaboração própria.

Nos termogramas dos componentes das formulações (Fig. 44-A), para COL foram observados três eventos térmicos. O pico à 85,7 °C (início: 39,7 °C; final: 124,7 °C, com ∆H de -203,8 J/g), corresponde a desidratação das fibras de colágeno. Esse fenômeno está relacionado com a desnaturação do colágeno (Td), quando há um aumento da temperatura ocorre quebra das ligações de hidrogênio entre as triplas hélices, resultando na perda de água em torno da molécula de colágeno (BADEA; USACHEVA; DELLA GATTA, 2015; LEÓN-MANCILLA et al., 2016). No pico à 226,8 °C (início: 217,4 °C; final: 231,9 °C) foi descrito como transição vítrea (Tg). E o último evento térmico foi observado à 272,6 °C (início: 253,7 °C; final: 290,7 °C; ΔH: -27,0 J/g), sendo correlacionado à decomposição de proteínas, devido à perda de ligações de hidrogênio (ALVES et al., 2018; LEÓN-MANCILLA et al., 2016).

No termograma do AH foi observado evento térmico à 120,1 °C (início: 117,9 °C; final: 122,8 °C; com ΔH de -8,2 J/g), indicando temperatura de fusão do AH, esse resultado é similar ao resultado encontrado na literatura (ALVES et al., 2019b). No termograma de SF houve pico à 69,1 °C (início: 44,4 °C; final: 88,9 °C; com ∆H de -58,3 J/g), indicando uma evaporação de água. E no pico observado à 290,8 °C (início: 273,1 °C; final: 300,0 °C; com  $\Delta$ H de -154,8 J/g) foi descrito como decomposição térmica (ALVES; ARANHA; CHAUD, 2018). Para o termograma de P407 foi apresentado um evento térmico à 56,1 °C (início: 53,6 °C; final: 57,9 °C; com ΔH de -151,7 J/g), relatado como temperatura de fusão (BEI et al., 2010; THAPA et al., 2015).

No termograma de PSR, para a faixa de temperatura analisada (25-300 °C) não foram evidenciados eventos térmicos. Para extratos de romã alguns estudos na literatura descrevem Tg e temperatura de fusão abaixo de zero, sendo em torno de -50 °C (AL-RAWAHI *et al.*, 2013; HOBANI; ELANSARI, 2004). Para termograma de DPPA foi observado evento térmico em 191,5 °C (início: 177,6; final: 203,8; com  $\Delta$ H de -74,4 J/g). Porém, não há estudos na literatura que descreva estudo termoanalítico de DPPA puro, contudo, nos dados do fabricante foi relatado uma temperatura de ebulição à 157 °C.

Nas formulações de CLL, no termograma de DT1-F21 foi observado dois eventos térmicos. Em 52,5 °C (início: 50,6 °C; final: 55,6 °C) e outro à 99,3 °C (início: 93,7 °C; final: 106,7 °C). Para a DT2-F21 também foram observados dois eventos térmicos, sendo em 53,9 °C (Início: 48,4 °C; Final: 57,2 °C) e à 103,7 °C (início: 98,3 °C; final: 109,5 °C). Esses resultados exibidos nas formulações de CLL confirmam a solubilização de monoleína (MO-18-92 ou MO-18-99), fase aquosa e hidrótropo (P407) para obtenção das nanopartículas. O DSC também é considerado um método de investigação e caracterização da formação das nanoestruturas líquido cristalinas, devido a temperatura ser um parâmetro crítico na autoorganização e ordenamento das moléculas de CLL (SOUZA *et al.*, 2020).

De acordo com os resultados dos termogramas dos *Scaffolds*-CLL (Fig. 44-B), todas as formulações apresentaram eventos térmicos entre 25-100 °C correspondente a COL (Td), sendo possível observar a interação e mistura miscível dos componentes usados para compor as formulações. E no evento térmico observado em 230 °C foi atribuído a um relaxamento das cadeias do COL, ocorre uma transição hélice-bobina indicando uma extensão intermolecular da reticulação (ALVES *et al.*, 2019a). Os resultados numéricos dos picos, início, final e  $\Delta$ H do *scaffold* funcionalizado estão apresentados na Tabela 12.

	Formulações			
Parâmetros avaliados	RC- DT1-F21	RC- DT2-F21	DC- DT1-F21	DC- DT2-F21
Pico (°C)	49,9	50,6	46,7	47,5
Início (°C)	46,0	46,9	43,2	44,2
Final (°C)	52,8	55,1	49,9	52,0
Entalpia calorimétrica - AH (I/g)	-1.6	-34	-2.0	-2.3

 Tabela 12 - Resultados numéricos dos picos, início, final e entalpia calorimétrica do Scaffold-CLL avaliado por DSC

Nota: As formulações variaram pelo tipo de agente reticulante RC (0,03% de PSR) e DC (0,03% de PSR) e formulação de CLL (DT1-F21 ou DT2-F21).

Fonte: Elaboração própria.

O pico (Td) é uma medida que representa densidade de reticulação. Assim, quando ocorre uma rigidez das triplas hélices do colágeno, resulta em baixa taxa de desnaturação (Td), causando uma maior temperatura de fusão (LAKRA *et al.*, 2014). Conforme descrito

por Meyer (2019), os valores de  $\Delta$ H refletem diretamente no número de ligações de hidrogênio, sendo um parâmetro que indica o grau da estrutura das triplas hélices. As triplas hélices do colágeno são mantidas associadas entre as ligações de hidrogênio, promovendo uma rede intramolecular e intermolecular. Essas ligações resultam em maior estabilidade do colágeno no processo de reticulação (LAKRA *et al.*, 2014).

De acordo com a Fig. 44-B e Tab. 12 foi possível sugerir que os eventos térmicos observados foram influenciados pela composição do *Scaffold*-CLL. Comparando os resultados o maior pico (Td) foi observado para RC-DT2-F21, onde RC-DT2-F21> RC-DT1-F21> DC-DT2-F21> DC-DT1-F21. No resultado de  $\Delta$ H o maior valor foi exibido para RC-DT2-F21, onde RC-DT2-F21> DC-DT2-F21> DC-DT2-F21> DC-DT1-F21> RC-DT1-F21. Dessa forma, a formulação de CLL com MO-18-99 (DT2-F21) reticulada com PSR (0,03%) apresentou melhores resultados, indicando que houve maior grau de reticulação, devido aumento das ligações de hidrogênio.

# 18.8 Características morfométricas

As características morfológicas e morfométricas do *Scaffold-CLL* foram avaliadas por microtomografia computadorizada tridimensional ( $\mu$ CT). A  $\mu$ CT é uma análise não destrutiva, capaz de obter imagens tridimensionais de dispositivos porosos em escala micrométrica, que obtêm imagens digitais e fornecem dados quantitativos e qualitativos sobre a morfologia tridimensional do biomaterial analisado (MASSIMINO *et al.*, 2020). Os resultados das características morfométricas estão apresentadas na Tabela 13 e Figura 45 estão apresentados os dados numéricos das características morfológicas.

	Formulações			
Parâmetros avaliados	RC- DT1-F21	RC- DT2-F21	DC- DT1-F21	DC- DT2-F21
Interconectividade de poros (%)	72,33	73,37	74,48	69,57
Volume de poros abertos (mm <sup>3</sup> )	6,13	4,31	3,62	7,67
Poros fechados (%)	0,03	0,03	0,03	0,04
Grau de anisotropia	0.74	0.89	0.87	0.79

 
 Tabela 13 - Resultados numéricos das características morfométricas do Scaffold-CLL avaliados por microtomografia computadorizada tridimensional

Nota: As formulações variaram pelo tipo de agente reticulante RC (0,03% de PSR) e DC (0,03% de PSR) e formulação de CLL (DT1-F21 ou DT2-F21).

Fonte: Elaboração própria.



Figura 45 - Resultados das características morfológicas do *Scaffold-CLL* avaliado por microtomografia computadorizada tridimensional

Nota: As formulações variaram pelo tipo de agente reticulante RC (0,03% de PSR) e DC (0,03% de PSR) e formulação de CLL (DT1-F21 ou DT2-F21). Fonte: Elaboração própria.

De acordo com as características morfológicas (Fig. 45) foi possível observar a densidade entre as formulações RC-DT1-F21, RC-DT2-F21, DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21. O maior grau de densidade foi evidenciado pelas regiões que apresentam coloração mais escuras, em tom de azul, essa densidade está diretamente relacionada ao grau de reticulação das formulações (SILVA *et al.*, 2014). Assim, esses resultados confirmam a reticulação dos *Scaffolds*-CLL.

A composição do *Scaffold*-CLL influenciou nos resultados numéricos das características morfométricas avaliados por  $\mu$ CT (Tab. 13). A formulação DC-DT1-F21 se destacou pelo maior valor de interconectividade de poros, DC-DT2-F21 pelo maior volume de poros abertos e fechados, e a formulação RC-DT2-F2 pelo maior grau de anisotropia. Embora, os resultados para percentual de interconectividade de poros, volume de poros abertos, percentual de poros fechados e grau de anisotropia serem considerados satisfatórios para todas formulações (RC-DT1-F21, RC-DT2-F21, DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21).

A porosidade é um parâmetro crítico a ser considerado na projeção de *scaffolds* aplicados na engenharia de tecido cardíaca, devido os *scaffolds* fornecerem um microambiente tridimensional adequado para suporte a nível celular, propiciando ligação, proliferação e diferenciação celular. O *scaffold* com porosidade adequada possui tamanhos específicos e similares ao tecido nativo a ser reparado, podendo influenciar no veículo para células e fornecendo de modo regular nutrientes e oxigênio. Assim, prevenindo a morte celular dependente de ancoragem (MASSIMINO *et al.*, 2020; PINA *et al.*, 2019).

Além da porosidade, o grau de anisotropia é um parâmetro crucial para direcionar nova diferenciação de tecido (MULDER; BUMA; HANNINK, 2009). Esse parâmetro pode ser influenciado pela escolha do método. A obtenção de *scaffolds* por compressão de plástica seguida de ultracongelamento e liofilização, tem sido amplamente usada na obtenção de matrizes tridimensionais porosas. *Scaffolds* desenvolvidas por ultracongelamento, formam matrizes com estruturas de poros anisotrópicos (ALVES *et al.*, 2019a).

O grau de anisotropia com valores mais próximos de zero, indicam estruturas isotrópicas, quando os valores estão mais próximos de 1, as amostras são consideradas estruturas anisotrópicas. Os *scaffolds* com características isotrópicas não apresentam relações estruturais e funcionais com o tecido nativo, mas quando têm características anisotrópicas, os *scaffolds* são fabricados com relação direta ao tecido nativo, com semelhanças estruturais hierárquicas de diversos tipos de células da MEC. Desse modo, o reparo tecidual com *scaffolds* anisotrópicos tendem a ser mais eficazes, por apresentarem arranjos arquitetônicos, anatomicamente mais semelhantes a morfologia celular e tecido nativo (MULDER; BUMA; HANNINK, 2009).

### 18.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens microscópicas usando MEV permitiu analisar as características morfológica em diferentes magnificações (100x, 250x e 500x) da superfície do *Scaffold*-CLL (RC-DT1-F21, RC-DT2-F21, DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21). Essas imagens estão apresentadas na Figura 45. Nas imagen de MEV (Fig 46) foi possível observar microestruturas porosas regulares contínuas, com distribuição uniforme de poros interligados. Porém, houve diferença na conformação e arranjo dos sistemas de poros nas formulações (RC-DT1-F21, RC-DT2-F21, DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21), indicando a influência da composição. Assim, esses resultados confirmam a porosidade descrita nos resultados obtidos por microtomografia computadorizada tridimensional (Fig. 45 e Tab. 13).

O miocárdio tem estrutrura única permitindo uma contração simultânea, sendo composto por fibras de músculo com tamanho entre 50-100  $\mu$ m de comprimento e diâmetro aproximadamente de 14  $\mu$ m (SAPIR et al., 2013). Os resultados da porosidade nas formulações avaliadas por MEV foram considerados adequados por estarem em escala micrométrica. O tamanho dos poros do *Scaffold*-CLL variaram entre 35 e 98  $\mu$ m. Na formulação de RC-DT1-F21 variou entre 93 e 98  $\mu$ m (91,1±8,6), para RC-DT2-F21 ficou em

torno de 72  $\mu$ m (72,2±0,14), na formulação de DC-DT1-F21 foi entre 35 e 41  $\mu$ m (38,0±2,9) e para DC-DT2-F21 variou entre 41 e 46  $\mu$ m (44,8±3,1).



Figura 46 - Resultados das imagens microscópicas dos *Scaffolds-CLL* com magnificação de 100x, 250x e 500x avaliados por MEV

Nota: (A) - RC-DT1-F21 em 100x, 250x e 500x; (B) - RC-DT2-F21 em 100x, 250x e 500x; (C) - DC-DT1-F21 em 100x, 250x e 500x; (D) - DC-DT2-F21 em 100x, 250x e 500x. As formulações variaram pelo tipo de agente reticulante RC (0,03% de PSR) e DC (0,03% de PSR) e formulação de CLL (DT1-F21 ou DT2-F21). Fonte: Elaboração própria.

# **19 CONCLUSÕES**

Na medicina regenerativa um dos principais requisitos e desafio na projeção de *scaffolds* aplicado no tecido cardíaco lesionado, consiste no potencial de condução e propagação de estímulo mioelétrico. Em nosso estudo a estratégia de associar os CLL aos *scaffolds* teve por finalidade permitir que o CLL apresentasse potencial de indução do estímulo mioelétrico.

Os *Scaffolds*-CLL foram caracterizados como semicondutores, assim possuem potencial para facilitar a propagação dos sinais elétricos na contração e auxiliando no direcionamento da proliferação e diferenciação das células mesenquimais e cardiomiócitos.

As propriedades mecânicas foram influenciadas pela composição, tipo de agente reticulante (PSR ou DPPA) e arranjo estrutural.

A capacidade de intumescimento e desintegração foram influenciado pelo grau de reticulação das formulações. A reticulação é um parâmetro crítico que reflete na redução ou absorção de fluídos, ou seja, quando ocorre menor perfil da capacidade de intumescimento, isso reflete diretamente na alta densidade de reticulação, resultando em menor flexibilidade e redução do volume livre entre as cadeias poliméricas. Para desintegração, a diminuição do tempo garante uma integridade estrutural e maior controle de perda de massa.

Nos espectros de FTIR foi possível concluir que houve interação química entre os componentes usados para compor as formulações. Para os termogramas obtidos por DSC foi concluído que houve interação entre os biopolímeros, sugerindo uma mistura miscível. As formulações foram caracterizadas como matrizes tridimensionais porosas, e essa porosidade foi confirmada pelas características morfométricas e morfológicas.

Diante disso, as formulações RC-DT1-F21, RC-DT2-F21, DC-DT1-F21 e DC-DT2-F21 foram consideradas matrizes tridimensionais porosas, com característica anisotrópica e semicondutora, que possuem viabilidade para atuar como suporte temporário na interação *Scaffold*-tecido cardíaco para aplicação após lesões causadas por infarto do miocárdio para promover reparo e recuperação tecidual.

# 20 PERSPECTIVAS FUTURAS

A medicina regenerativa é uma área que engloba todo processo científico no reparo, melhoria e progresso da recuperação em nível funcional e tecidual. Atualmente, os estudos científicos envolvendo o desenvolvimento e aplicação de dispositivos biológicos tem avançado significativamente, assim como estudos dos *scaffolds* para aplicação na engenharia de tecido cardíaco. Embora sejam expressivos os avanços científicos, ainda é necessário investimento de novos estudos a fim de contribuir para projeção, desenvolvimento e aplicação de *scaffolds* cardíacos.

Nesse estudo as etapas futuras se concentram, principalmente, na (i) avaliação de bioadesão (mecânica) entre *scaffold*-CLL e tecido cardíaco; (ii) avaliar a capacidade antioxidante do *scaffold*-CLL; (iii) avaliação *in vitro* de citotoxicidade, viabilidade celular, adesão celular e genotoxicidade e (iv) avaliação *in vivo* da eficiência de reparo tecidual, bem como, acompanhamento de marcadores bioquímicos, hematológicos e mecanismo de estresse oxidativo.

# 21 REFERÊNCIAS

ABDELAZIZ, H. M. *et al.* Liquid crystalline assembly for potential combinatorial chemo-herbal drug delivery to lung cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 499–517, 2019.

ABE, S.; TAKAHASHI, H. A comparative study of the effects of dimethylsulfoxide and glycerol on the bicontinuous cubic structure of hydrated monoolein and its phase behavior. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 147, n. 2, p. 59–68, 2007.

AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. Journal of Advanced Research, v. 6, n. 2, p. 105–121, 2015.

AL-RAWAHI, A. *et al.* Thermal characteristics of a water soluble extract obtained from pomegranate skin: Developing a state diagram for determining stability. **Industrial Crops and Products**, v. 48, p. 198–204, 2013.

ALAM, M. M.; ARAMAKI, K. Liquid Crystal-Based Emulsions : Progress and Prospects. Journal of oleo science, v. 108, n. 2, p. 97–108, 2014.

ALVES, T. *et al.* Dense lamellar scaffold, biomimetically inspired, for reverse cardiac remodeling: Effect of proanthocyanidins and glutaraldehyde. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 0, n. 0, p. 1–14, 2019a.

ALVES, T. *et al.* Biomimetic dense lamellar scaffold based on a colloidal complex of the polyaniline (PANi) and biopolymers for electroactive and physiomechanical stimulation of the myocardial. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 579, n. May, p. 123650, 2019b.

ALVES, T. F. R. *et al.* Dense Lamellar Scaffold as Biomimetic Materials for Reverse Engineering of Myocardial Tissue : Preparation, Characterization and Physiomechanical Properties. **Journal of Material Science & Engineering**, v. 7, n. 5, 2018.

ALVES, T. F. R.; ARANHA, N.; CHAUD, M. V. Mechanical stress and thermal treatments induced alpha-helix to beta-sheet transition in silk fibroin films. **International Journal of Drug Research and Technology**, v. 8, n. 3, p. 149–157, 2018.

AMBIGAIPALAN, P.; CAMARGO, A. C. DE; SHAHIDI, F. Phenolic Compounds of Pomegranate Byproducts (Outer Skin, Mesocarp, Divider Membrane) and Their Antioxidant Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 34, p. 6584–6604, 2016.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos : Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2006.

ANLAUF, H. Recent developments in centrifuge technology. **Separation and Purification Technology**, v. 58, n. 2, p. 242–246, 2007.

ARNAL-PASTOR, M. *et al.* Biomaterials for cardiac tissue engineering. **Regenerative Medicine and Tissue Engineering**. InTech. p. 275–323, 2013.

AVACHAT, A. M.; PARPANI, S. S. Formulation and development of bicontinuous nanostructured liquid crystalline particles of efavirenz. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 87–97, 2015.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M. Pomegranate for Your Cardiovascular Health. **Rambam Maimonides** Medical Journal, v. 4, n. 2, p. e0013, 2013.

BADEA, E.; USACHEVA, T. R.; DELLA GATTA, G. The Use of differential scanning calorimetry to characterise collagen deterioration in parchment. **Rossijskij Khimicheskij Zhurnal**, v. 1, n. 2, p. 28–41, 2015.

BAHEIRAEI, N. *et al.* Synthesis, characterization and antioxidant activity of a novel electroactive and biodegradable polyurethane for cardiac tissue engineering application. **Materials Science and Engineering C**, v. 44, p. 24–37, 2014.

BALMERT, S. C.; LITTLE, S. R. Biomimetic delivery with micro- and nanoparticles. Advanced Materials, v. 24, 28, p. 375-3778, 2012.

BAOLIN, G.; PETER X., M. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering : a brief review. **Science China Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 490–500, 2014.

BASSIRI-JAHROMI, S.; DOOSTKAM, A. Comparative evaluation of bioactive compounds of various cultivars of pomegranate (Punica granatum) in different world regions. **AIMS Agriculture and Food**, v. 4, n. 1, p. 41–55, 2019.

BECHTOLD, I. H. Cristais líquidos: um sistema complexo de simples aplicação. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 27, n. 3, p. 333–342, 2005a.

BECHTOLD, I. H. Cristais líquidos: Um sistema complexo de simples aplicação. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. v.27, n.3, p. 333–342, 2005b.

BEI, D. *et al.* Formulation of dacarbazine-loaded cubosomes. Part III. Physicochemical characterization. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1243–1249, 2010.

BENJAMIN, E. J. *et al.* Heart disease and stroke statistics - 2017 update: a report from the american heart association. **Circulation.** v. 135, 10, p. e146-e603, 2017.

BENKADDOUR, A. *et al.* Study of the effect of grafting method on surface polarity of tempo-oxidized nanocellulose using polycaprolactone as the modifying compound: esterification versus click-chemistry. **Nanomaterials**, v. 3, n. 4, p. 638–654, 2013.

BERRY, M. F. *et al.* Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 6, p. 2196–2203, 2006.

BISOYI, H. K.; KUMAR, S. Liquid-crystal nanoscience: An emerging avenue of soft self-assembly. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 1, p. 306–319, 2011.

BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from limonium brasiliense L. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6852–6865, 2013.

BORDIGNON JR., C. L. *et al.* Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 183–188, 2009.

BORGHETI-CARDOSO, L. N. *et al.* An in situ gelling liquid crystalline system based on monoglycerides and polyethylenimine for local delivery of siRNAs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, p. 103–117, 2015.

BORRIELLO, A. et al. Optimizing PANi doped electroactive substrates as patches for the regeneration of cardiac muscle. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 4, p. 1053–1062, 2011.

BROWN, R. A. *et al.* Ultrarapid engineering of biomimetic materials and tissues: Fabrication of nano- and microstructures by plastic compression. Advanced Functional Materials, v. 15, n. 11, p. 1762–1770, 2005.

CALIXTO, G. M. F. *et al.* Design and Characterization of a Novel p1025 Peptide-Loaded Liquid Crystalline System for the Treatment of Dental Caries. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 1–10, 2016.

ÇAM, M.; İÇYER, N. C. Phenolics of pomegranate peels: extraction optimization by central composite design and alpha glucosidase inhibition potentials. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 3, p. 1489–1497, 2013.

CAMPOS, P. M. *et al.* Liquid crystalline nanodispersion functionalized with cell-penetrating peptides improves skin penetration and anti-inflammatory effect of lipoic acid after in vivo skin exposure to UVB radiation. **Drug Delivery and Translational Research**, p. 1–19, 2020.

CARLIN, N. *et al.* Birrefringência em placas de onda e atividade óptica de uma solução de açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 27, n. 3, p. 349–355, 2005.

CARVALHO, F. C. *et al.* Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 1, p. 219–227, 2013.

CHAN, B. P.; LEONG, K. W. Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations. **European Spine Journal**, v. 17, n. 4, p. S467–S479, 2008.

CHANG, C. M.; BODMEIER, R. Swelling of and drug release from monoglyceride-based drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 6, p. 747–752, 1997.

CHAUD, M. V *et al.* Three-Dimensional and Biomimetic Technology in Cardiac Injury After Myocardial Infarction: Effect of Acellular Devices on Ventricular Function and Cardiac Remodelling. In: BAINO, F. (Ed.). . **Scaffolds in Tissue Engineering - Materials, Technologies and Clinical Applications**. 1a. ed. InTech., p. 227–251, 2017.

CHAUDHARY, K. K.; KANNOJIA, P.; MISHRA, N. Liquid Crystal Systems in Drug Delivery. Hershey, PA, USA, 2017.

CHO, E. J. *et al.* Nanoparticle characterization: State of the art, challendes, and emerging technologies. **Molecular pharmaceutical**, 2013.

CHOI, Y.; KIM, H.-J.; MIN, K.-S. Effects of proanthocyanidin, a crosslinking agent, on physical and biological properties of collagen hydrogel scaffold. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 41, n. 4, p. 296, 2016.

COLDEA, T. E. *et al.* Rapid quantitative analysis of ethanol and prediction of methanol content in traditional fruit brandies from romania, using FTIR spectroscopy and chemometrics. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 41, n. 1, p. 143–149, 2013.

COLLINS, M. N.; BIRKINSHAW, C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1262–1279, 2013.

D'ANTONA, P. *et al.* Rheologic and NMR characterization of monoglyceride-based formulations. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 1, p. 40–52, 2000.

D'ARCHIVIO, M. *et al.* Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348–361, 2007.

DANTE, M. DE C. L. *et al.* Liquid Crystalline Systems Based on Glyceryl Monooleate and Penetration Enhancers for Skin Delivery of Celecoxib: Characterization, In Vitro Drug Release, and In Vivo Studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 3, p. 870–878, 2018.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMENEZ, A. R.; PAREDES-LOPEZ, O. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains - Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. p. 173–289, 2010.

DHANDAYUTHAPANI, B. *et al.* Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. **International Journal of Polymer Science**, v. 2011, n. ii, 2011.

DINIZ, I. M. A. *et al.* Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. **J Mater Sci: Mater Med**, 2015.

DUMORTIER, G. *et al.* A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p. 2709–2728, 2006.

DUTT, S.; SIRIL, P. F.; REMITA, S. Swollen liquid crystals (SLCs): A versatile template for the synthesis of nano structured materials. **RSC Advances**, v. 7, p. 5733–5750, 2017.

EDISON, T. J. I.; SETHURAMAN, M. G. Biogenic robust synthesis of silver nanoparticles using Punica granatum peel and its application as a green catalyst for the reduction of an anthropogenic pollutant 4nitrophenol. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 104, p. 262–264, 2013.

EL-REFAIE, W. M. *et al.* Novel curcumin-loaded gel-core hyaluosomes with promising burn-wound healing potential: Development, in-vitro appraisal and in-vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 486, n. 1–2, p. 88–98, 2015.

ELKATATNY, S. *et al.* Development of a new correlation to determine the static Young's modulus. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, v. 8, n. 1, p. 17–30, 2018.

ELTOM, A.; ZHONG, G.; MUHAMMAD, A. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. Advances in Materials Science and Engineering, v. 2019, p. 1–13, 2019.

ENGLER, A. J. *et al.* Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: Scar-like rigidity inhibits beating. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 22, p. 3794–3802, 2008.

FAWOLE, O. A.; OPARA, U. L. Stability of total phenolic concentration and antioxidant capacity of extracts from pomegranate co-products subjected to in vitro digestion. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2016.

FINKEL, R.; CUBEDDU, L. X.; CLARK, M. A. Tratamento da insuficiência cardíaca. In: ARTMED (Ed.). . Farmacologia ilustrada. 4º Edição ed. Porto Alegre-RS. p. 183–196.

FONSECA-SANTOS, B. Sistemas precursores de cristais liquidos mucoadesivos para administração bucal de curcumina no tratamento do câncer bucal. Dissertação de Mestrado. **Programa de Pós-graduação Ciências Farmacêuticas**, 2015.

FONSECA-SANTOS, B. *et al.* Design, characterization, and biological evaluation of curcumin-loaded surfactant-based systems for topical drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, n. September, p. 4553–4562, 2016.

FONSECA, L. M. *et al.* Electrospinning of native and anionic corn starch fibers with different amylose contents. **Food Research International**, v. 116, p. 1318–1326, 2019.

FRANTZ, S.; BAUERSACHS, J.; ERTL, G. Post-infarct remodelling: Contribution of wound healing and inflammationCardiovascular Research, 2009.

FREITAS, V. O mundo colorido das antocianinas. Revista de Ciência Elementar, v. 7, n. 2, p. 1–6, 2019.

GANEM-QUINTANAR, A. *et al.* Monoolein: A Review of the Pharmaceutical Applications. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 8, p. 809–820, 2000.

GARIDEL, P. *et al.* Self-Organisation, Thermotropic and Lyotropic Properties of Glycolipids Related to their Biological Implications. p. 49–72, 2015.

GOA, K. L.; BENFIELD, P. Hyaluronic acid: a review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. **Drugs**, v. 47, n. 3, p. 536–566, 1994.

GREMIÃO, M. P. D.; CASTRO, A. D. Considerações sobre o processo de dissolução na preparação de dispersões moleculares. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 9, n. 1/5, p. 7–11, 1999.

GROVER, C. N.; CAMERON, R. E.; BEST, S. M. Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, v. 10, p. 62–74, 2012.

GU, Y. *et al.* Chitosan/silk fibroin-based, Schwann cell-derived extracellular matrix-modified scaffolds for bridging rat sciatic nerve gaps. **Biomaterials**, v. 35, n. 7, p. 2253–2263, 2014.

GUO, C. *et al.* Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 23–24, p. 1032–1040, 2010.

GUPTA, N. *et al.* Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 1, n. 1, p. 63–81, 2016.

HASHIMOTO, H.; OLSON, E. N.; BASSEL-DUBY, R. Therapeutic approaches for cardiac regeneration and repair. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 10, p. 585–600, 2018.

HIRST, L. S. *et al.* Phase separation and critical phenomena in biomimetic ternary lipid mixtures. n. October 2013, p. 37–41, 2011.

HOBANI, A. I.; ELANSARI, A. M. Thermal transitions of pomegranate extracts using Modulated Differential Scanning Calorimeter (MDSC). **International Journal of Food Properties**, v. 7, n. 3, p. 671–681, 2004.

HUGHES, O. B. et al. A review of cellular and acellular matrix products: Indications, techniques, and outcomes. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 138, n. 3, p. 138S-147S, 2016.

JIN, X. *et al.* A nanostructured liquid crystalline formulation of 20(S)-protopanaxadiol with improved oral absorption. **Fitoterapia**, v. 84, n. 1, p. 64–71, 2013.

JINDAL, N.; MEHTA, S. K. Nevirapine loaded Poloxamer 407/Pluronic P123 mixed micelles: Optimization of formulation and in vitro evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 129, p. 100–106, 2015.

KATZ, M. G. *et al.* Safety and efficacy of high-dose adeno-associated virus 9 encoding sarcoplasmic reticulum Ca2+ adenosine triphosphatase delivered by molecular cardiac surgery with recirculating delivery in ovine ischemic cardiomyopathy. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 148, n. 3, p. 1065–1073, 2014.

KAWAMOTO, H. Tha History of Liquid-Crystal Displays. Proceedings of the IEEE, v. 90, n. 4, p. 1–41, 2002.

KHOO, H. E. *et al.* Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food and Nutrition Research**, v. 61, n. 1, p. 1–21, 2017.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e biologia celular**. 3 edição ed. Rio de Janeiro/RJ: Elsevier Editora, 2012.

KIM, U. J. *et al.* Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2775–2785, 2005.

KOMATSU, D. *et al.* Characterization of Membrane of Poly (L,co-D,L-lactic acid-co-trimethylene carbonate) (PLDLA-co-TMC) (50/50) loaded with Silk Fibroin. **SDRP Journal of Biomedical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 32–42, 2017.

KUNDU, B. *et al.* Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 65, n. 4, p. 457–470, 2013.

LAKRA, R. *et al.* Enhanced stabilization of collagen by furfural. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 252–257, 2014.

LANCELOT, A.; SIERRA, T.; SERRANO, J. L. Nanostructured liquid-crystalline particles for drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 4, p. 547–564, 2014.

LARA, M. G.; BENTLEY, M. V. L. B.; COLLETT, J. H. In vitro drug release mechanism and drug loading studies of cubic phase gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, n. 1–2, p. 241–250, 2005.

LEE, D. R. *et al.* Liquid crystal nanoparticle formulation as an oral drug delivery system for liver-specific distribution. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 853–871, 2016.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1269–1278, 2005.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering. Chemical reviews, v. 101, n. 7, 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. 77–86, 2016.

LI, Z. *et al.* Epidemiology and Clinical Characteristics of Cryptococcal Meningitis in China (1981-2013): A Review of the Literature. **Medical Micology**, v. 3, p. 1–6, 2017.

LIAO, R. *et al.* The bone marrow - cardiac axis for myocardial regeneration. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 50, n. 1, p. 18–30, 2008.

LIM, E. K. *et al.* Hyaluronan-modified magnetic nanoclusters for detection of CD44-overexpressing breast cancer by MR imaging. **Biomaterials**, v. 32, n. 31, p. 7941–7950, 2011.

LINGWOOD, D.; SIMONS, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. Science (New York, N.Y.), v. 327, n. 5961, p. 46–50, 2010.

LIU, H. *et al.* Incorporating simvastatin/poloxamer 407 hydrogel into 3D-printed porous Ti6Al4V scaffolds for the promotion of angiogenesis, osseointegration and bone ingrowth. **Biofabrication**, v. 8, n. 4, p. 1–13, 2016.

LIU, X.; HOLZWARTH, J. M.; MA, P. X. Functionalized Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. **Macromolecular Bioscience**, p. 1–9, 2012.

LIU, Y. *et al.* Redox-sensitive Pluronic F127-tocopherol micelles : synthesis , characterization , and cytotoxicity evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2635–2644, 2017.

LOPES, L. B. *et al.* Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: Characterization and study of in vitro and in vivo delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 2, p. 146–155, 2006.

LUGGER, J. et al. Nanoporous polymers based on liquid crystals. Materials, v. 11, n. 1, 2018.

MADHESWARAN, T. *et al.* Enhanced Topical Delivery of Finasteride Using Glyceryl Monooleate-Based Liquid Crystalline Nanoparticles Stabilized by Cremophor Surfactants. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 1, p. 44–51, 2013.

MADHESWARAN, T. *et al.* Current potential and challenges in the advances of liquid crystalline nanoparticles as drug delivery systems. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 7, p. 1405–1412, 2019.

MANGINI, S. et al. Heart transplantation: review. Einstein (São Paulo, Brazil), v. 13, n. 2, p. 310-318, 2015.

MANO, E. B. Polímeros como materiais de Engenharia. São Paulo ed. 1991.

MARCATO, P. D. Preparation, caracterization and application in drugs and cosmetics of solid lipid nanoparticles. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 2, p. 01–31, 2009.

MARINUCCI, L. *et al.* Biocompatibility of collagen membranes crosslinked with glutaraldehyde or diphenylphosphoryl azide: An in vitro study. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 67, n. 2, p. 504–509, 2003.

MARTÍN, J. *et al.* Anthocyanin Pigments: Importance, Sample Preparation and Extraction. In: **Phenolic** Compounds - Natural Sources, Importance and Applications. p. 117–152, 2017.

MARTÍNEZ, A. *et al.* Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 606–619, 2015.

MASSIMINO, L. C. *et al.* Use of collagen and auricular cartilage in bioengineering: scaffolds for tissue regeneration. **Cell and Tissue Banking**, p. 1–12, 2020.

MEDEIROS, J. DE; KANIS, L. A. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de Mikania glomerata Spreng., Asteraceae, e Passiflora edulis Sims, Passifloraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 796–802, 2010.

MERZLYAK, A. *et al.* Genetically Engineered Nanofiber-Like Viruses For Tissue Regenerating Materials 2009. **Nano Letters**, v. 9, n. 2, p. 846–852, 2009.

MEYER, M. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. **BioMedical Engineering Online**, v. 18, n. 1, p. 1–74, 2019.

MITOV, M. Liquid-crystal science from 1888 to 1922: building a revolution. **ChemPhysChem**, v. 15, n. 7, p. 1245–1250, 2014.

MONTANARI, T. Tecido muscular. In: Atlas digital de biologia celular e tecidual. Porto Alegre/RS. v. 1p. 63–67, 2016.

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

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A, v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, 2004.

NASCIMENTO JÚNIOR, B. J. *et al.* Estudo da ação da romã (Punica granatum L.) na cicatrização de úlceras induzidas por queimadura em dorso de língua de ratos Wistar (Rattus norvegicus). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 423–432, 2016.

NAZAROV, R.; JIN, H.-J.; KAPLAN, D. Porous 3-D scaffolds from regenerated Antheraea pernyi silk fibroin. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 19, n. 3, p. 207–212, 2008.

NAZARUK, E. *et al.* Design and assembly of pH-sensitive lipidic cubic phase matrices for drug release. **Langmuir**, v. 30, n. 5, p. 1383–1390, 2014.

NECAS, J. et al. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. Veterinarni Medicina, v. 53, n. 8, p. 397-411, 2008.

NGUYEN, D. T. *et al.* Pirfenidone mitigates left ventricular fibrosis and dysfunction after myocardial infarction and reduces arrhythmias. **Heart Rhythm**, v. 7, n. 10, p. 1438–1445, 2010.

NILSSON, A.; HOLMGREN, A.; LINDBLOM, G. FTIR study of lamellar and reversed micellar phases in the mono-oleoylglycerol/water system. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 69, n. 3, p. 219–227, 1994.

OLIVEIRA, R. N. *et al.* Análise por FTIR e quantificação de fenóis e flavonóides de cinco produtos naturais disponíveis comercialmente utilizados no tratamento de feridas. **Revista Materia**, v. 21, n. 3, p. 767–779, 2016.

OLIVEIRA, S. V *et al.* Caracterização química e morfológica do pirofosfato de cálcio obtido por via úmida. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, p. 11–20, 2009.

ÖMEROĜLU AY, Ç. *et al.* Characterization of Punica granatum L. peels and quantitatively determination of its biosorption behavior towards lead(II) ions and Acid Blue 40. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 100, p. 197–204, 2012.

ORYAN, 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, 2018.

PAN, X. *et al.* Nanostructured cubosomes as advanced drug delivery system. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 35, p. 6290–7, 2013.

PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. **Materials**, v. 3, n. 3, p. 1863–1887, 2010.

PARK, S.-H. *et al.* Silk-Fibrin/Hyaluronic Acid Composite Gels for Nucleus Pulposus Tissue Regeneration. **Tissue Engineering Part A**, v. 17, n. 23–24, p. 2999–3009, 2011.

PERNG, C. K. *et al.* In vivo angiogenesis effect of porous collagen scaffold with hyaluronic acid oligosaccharides. Journal of Surgical Research, v. 168, n. 1, p. 9–15, 2011.

PETITE, H. *et al.* Use of diphenylphosphorylazide for cross-linking collagen-based biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 28, n. 2, p. 159–165, 1994.

PINA, S. *et al.* Scaffolding strategies for tissue engineering and regenerative medicine applications. **Materials**, v. 12, n. 11, p. 1–42, 2019.

PINHEIRO, A. *et al.* Comparison of natural crosslinking agents for the stabilization of xenogenic articular cartilage. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 34, n. 6, p. 1037–1046, 2015.

PUTNIK, P. *et al.* Comparing the effects of thermal and non-thermal technologies on pomegranate juice quality: A review. **Food Chemistry**, v. 279, p. 150–161, 2018.

RADHAKRISHNAN, S.; NAGARAJAN, S.; BECHELANY, M. collagen based biomaterials for tissue engineering applications : a review. **Processes and Phenomena on the Boundary Between Biogenic and Abiogenic Nature**. Switzerland: Springer Nature Switerland, p. 3–22, 2020.

RAJABALAYA, R. *et al.* Oral and transdermal drug delivery systems: Role of lipid-based lyotropic liquid crystals. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 393–406, 2017.

RAJAK, P.; NATH, L. K.; BHUYAN, B. Liquid crystals: An approach in drug delivery. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, n. 1, p. 11–23, 2018.

RAMÍREZ-RAMÍREZ, F. J. Fisiología cardiaca. Revista Médica MD, v. 1, n. 3, p. 3–6, 2009.

RANE, A. A.; CHRISTMAN, K. L. Biomaterials for the treatment of myocardial infarction: A 5-year update. **Journal of the American College of Cardiology**, 2011.

RIZWAN, S. B. *et al.* Characterisation of bicontinuous cubic liquid crystalline systems of phytantriol and water using cryo field emission scanning electron microscopy (cryo FESEM). **Micron**, v. 38, n. 5, p. 478–485, 2007.

RIZWANA, H.; ALWHIBI, M. S.; SOLIMAN, D. A. Antimicrobial activity and chemical composition of flowers of Matricaria aurea a native herb of Saudi Arabia. **International Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 6, p. 576–586, 2016.

ROBBINS, L. A.; CUSACK, R. W. Liquid-liquid extraction operations. Perry's chemical engineers' handbook. p. 15-1-15–48, 1999.

ROCHE, S. et al. Native and DPPA cross-linked collagen sponges seeded with fetal bovine epiphyseal chondrocytes used for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, v. 22, n. 1, p. 9–18, 2000.

RODRIGUES, I. C. P. *et al.* Cardiac tissue engineering: current state-of-the-art materials, cells and tissue formation. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 16, n. 3, p. eRB4538, 2018.

SALLENT, I.; CAPELLA-MONSONÍS, H.; ZEUGOLIS, D. Production and Characterization of Chemically Cross-Linked Collagen Scaffolds. In: **Collagen: Methods and protocols, methods in molecular biology**. v. 1944p. 23–38, 2019.

SAMPAIO, G. Y. H. *et al.* Biodegradable Chitosan scaffolds: Effect of Genipin crosslinking. Materials Science Forum, v. 805, p. 116–121, 2015.

SANTIAGO-MARTORAL, L.; FIGUEROA, A.; NICOLAU, E. Lyotropic Liquid Crystal-Based Membranes for Water Remediation: Fabrication, Characterization and Performance Evaluation. **ACS Omega**, v. 5, n. 29, p. 17940–17946, 2020.

SAPIR, Y. et al. Nanomaterials for cardiac tissue engineering. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2013.

SARIG, U.; MACHLUF, M. Engineering cell platforms for myocardial regeneration. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 11, n. 8, p. 1055–1077, 2011.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quimica Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SEIF-NARAGHI, S. B. *et al.* Safety and efficacy of an injectable extracellular matrix hydrogel for treating myocardial infarction. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 173, 2013.

SERPOOSHAN, V. *et al.* The effect of bioengineered acellular collagen patch on cardiac remodeling and ventricular function post myocardial infarction. **Biomaterials**, p. 1–8, 2013.

SERPOOSHAN, V.; WU, S. M. Patching up broken hearts: Cardiac cell therapy gets a bioengineered boost. Cell Stem Cell, v. 15, n. 6, p. 671–673, 2014.

SHAIDI, F.; NACZK, M. Analysis of polyphenols in foods. In: Methods of analysis of food components and additives. p. 199–259, 2005.

SHAN, Q. Q. *et al.* Cubic and hexagonal liquid crystals as drug carriers for the transdermal delivery of triptolide. **Drug Delivery**, v. 26, n. 1, p. 490–498, 2019.

SHAPIRA, A.; FEINER, R.; DVIR, T. Composite biomaterial scaffolds for cardiac tissue engineering. **International Materials Reviews**, v. 61, n. 1, p. 1–19, 2016.

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

SINGELYN, J. M. *et al.* Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5409–5416, 2009.

SINGHVI, G.; BANERJEE, S.; KHOSA, A. Lyotropic liquid crystal nanoparticles: A novel improved lipidic drug delivery system. In: **Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery**. Elsevier Inc., p. 471–517, 2018.

SONG, Y. et al. In situ formation of injectable chitosan-gelatin hydrogels through double crosslinking for sustained intraocular drug delivery. **Materials Science and Engineering C**, v. 88, n. March, p. 1–12, 2018.

SOUZA, J. F. *et al.* Spotlight on Biomimetic Systems Based on Lyotropic. **Molecules**, v. 22, n. 419, p. 1–15, 2017.

SOUZA, J. F. DE et al. Structural comparison, physicochemical properties, and in vitro release profile of curcumin-loaded lyotropic liquid crystalline nanoparticle: Influence of hydrotrope as interface stabilizers. **Journal of Molecular Liquids**, v. 306, p. 112861, 2020.

SVYSTONYUK, D. A.; MEWHORT, H. E. M.; FEDAK, P. W. M. Using Acellular Bioactive Extracellular Matrix Scaffolds to Enhance Endogenous Cardiac Repair. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 5, n. April, p. 1–8, 2018.

TALASAZ, H. H. *et al.* In situ gel forming systems of poloxamer 407 and hydroxypropyl methylcellulose mixtures for controlled delivery of vancomycin. **Journal of aplied polymers science**, v. 4, p. 2369–2374, 2008.

TANG, H. *et al.* Formation of insolubles in palm oil-, yellow grease-, and soybean oil-based biodiesel blends after cold soaking at 4 °c. **JAOCS**, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 12, p. 1173–1182, 2008.

TAYLOR, D. A.; PARIKH, R. B.; SAMPAIO, L. C. Bioengineering Hearts: Simple yet Complex. Current Stem Cell Reports, v. 3, n. 1, p. 35–44, 2017.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v. 55, n. 4, p. 297–304, 2008.

THAPA, R. K. *et al.* Multilayer-coated liquid crystalline nanoparticles for effective sorafenib delivery to hepatocellular carcinoma. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 36, p. 20360–20368, 2015.

TRIFKOVIĆ, K. *et al.* Chitosan crosslinked microparticles with encapsulated polyphenols: Water sorption and release properties. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 30, n. 5, p. 618–631, 2015.

USHA, R.; SREERAM, K. J.; MANDAL, A. B. Organization of collagen in the presence of diphenyl phosphoryl azide (DPPA): An in vitro study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 109, p. 121–128, 2013.

VAKILI, V. *et al.* Towards Biomimetic Concept Generation. **ASME 2001 Design Engineering Technical Conferences Design Theory and Methodology**, 2016.

VALENCIA, C. *et al.* Synthesis and application of scaffolds of chitosan-graphene oxide by the freeze-drying method for tissue regeneration. **Molecules**, v. 23, n. 10, 2018.

VIDAL, C. M. P. *et al.* Collagen-collagen interactions mediated by plant-derived proanthocyanidins: A spectroscopic and atomic force microscopy study. **Acta Biomaterialia**, v. 41, p. 110–118, 2016.

WALKER, C. A.; SPINALE, F. G. The structure and function of the cardiac myocyte: A review of fundamental concepts. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, v. 118, n. 2, p. 375–382, 1999.

WANG, N. *et al.* Hyaluronic acid oligosaccharides improve myocardial function reconstruction and angiogenesis against myocardial infarction by regulation of macrophages. **Theranostics**, v. 9, n. 7, p. 1980–1992, 2019.

WANG, S. *et al.* Chitosan/gelatin porous scaffolds assembled with conductive poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanoparticles for neural tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 24, p. 4774–4788, 2017.

WANG, Y. *et al.* Improved permeation performance of Pluronic F127-polyethersulfone blend ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 282, n. 1–2, p. 44–51, 2006.

WANG, Z. Extract of Phenolics From Pomegranate Peels. **The Open Food Science Journal**, v. 5, n. 1, p. 17–25, 2011.

WEBBER, M. J. et al. Supramolecular biomaterials. Nature Materials, v. 15, n. 1, p. 13-26, 2015.

WEI, Y. *et al.* Integrated oxidized-hyaluronic acid/collagen hydrogel with  $\beta$ -TCP using proanthocyanidins as a crosslinker for drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, 2018.

WENDEL, J. S. *et al.* Functional Effects of a Tissue-Engineered Cardiac Patch From Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Rat Infarct Model. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1324–1332, 2015.

WHO. **Cardiovascular diseases**. Disponível em: <a href="https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds">https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)</a>. Acesso em: 10 de outubro de 2020.

YANG, Y.; RITCHIE, A. C.; EVERITT, N. M. Comparison of glutaraldehyde and procyanidin cross-linked scaffolds for soft tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, p. 263–273, 2017.

YU, M. *et al.* Hyaluronic acid modified mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery to CD44overexpressing cancer cells. **Nanoscale**, v. 5, n. 1, p. 178–183, 2013.

ZHAI, J. *et al.* Non-Lamellar Lyotropic Liquid Crystalline Lipid Nanoparticles for the Next Generation of Nanomedicine. **ACS Nano**, v. 13, n. 6, p. 6178–6206, 2019.

ZHAI, W. *et al.* Crosslinking of saphenous vein ECM by procyanidins for small diameter blood vessel replacement. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 102, n. 6, p. 1190–1198, 2013.

# 22 ANEXO A

"Polyphenols isolated from pomegranate juice (Punica granatum L.): Evaluation of physicalchemical properties by FTIR and quantification of total polyphenols and anthocyanins content" publicado na revista Brazilian Journal of Development em Setembro de 2020. Artigo disponível em: <a href="https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/16000/13108">https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/16000/13108</a>>. DOI: 10.34117/bjdv6n9-017

Polyphenols isolated from pomegranate juice (*Punica granatum L*.): Evaluation of physical-chemical properties by FTIR and quantification of total polyphenols and anthocyanins content

Isolamento de polifenóis do suco da romã (*Punica granatum L*.): Avaliação das propriedades físicoquímica por FTIR e quantificação do teor total de polifenóis e antocianinas

#### Juliana Ferreira de Souza

PhD student in Pharmaceutical Science by University of Sorocaba, UNISO, Brazil. Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology, University of Sorocaba. Raposo Tavares, Km 92.5, Sorocaba, São Paulo, Brazil. e-mail: julianafsz@yahoo.com.br

#### Venâncio Alves Amaral

PhD student in Pharmaceutical Science by University of Sorocaba, UNISO, Brazil. Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology, University of Sorocaba. Raposo Tavares, Km 92.5, Sorocaba, São Paulo, Brazil. e-mail: venancio\_mt@hotmail.com

### **Thais Francine Ribeiro Alves**

PhD in Pharmaceutical Science by University of Sorocaba, UNISO, Brazil. Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology, University of Sorocaba. Raposo Tavares, Km 92.5, Sorocaba, São Paulo, Brazil. e-mail: thaisfrancine1@hotmail.com

#### **Fernando Batain**

PhD student in Pharmaceutical Science by University of Sorocaba, UNISO, Brazil. Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology, University of Sorocaba. Raposo Tavares, Km 92.5, Sorocaba, São Paulo, Brazil. e-mail: fbatain@gmail.com

### Kessi Marie de Moura Crescencio

PhD student in Pharmaceutical Science by University of Sorocaba, UNISO, Brazil. Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology, University of Sorocaba. Raposo Tavares, Km 92.5, Sorocaba, São Paulo, Brazil. e-mail: kessicrescencio@yahoo.com.br

### Cecilia Torqueti de Barros

PhD student in Pharmaceutical Science by University of Sorocaba, UNISO, Brazil. Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology, University of Sorocaba. Raposo Tavares, Km 92.5, Sorocaba, São Paulo, Brazil. e-mail: ceciliatorquetti@gmail.com

#### Alessandra Candida Rios

PhD student in Pharmaceutical Science by University of Sorocaba, UNISO, Brazil. Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology, University of Sorocaba. Raposo Tavares, Km 92.5, Sorocaba, São Paulo, Brazil. e-mail: alele.rios@yahoo.com.br

### Marco Vinícius Chaud

PhD in Drugs and Medicines by University of São Paulo, USP, Brazil. Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology, University of Sorocaba. Raposo Tavares, Km 92.5, Sorocaba, São Paulo, Brazil. e-mail: marco.chaud@prof.uniso.br

### ABSTRACT

Pomegranate (*Punica granatum L.*) is a polyphenols source, such as anthocyanins, punicalagin, ellagitannins and tannins. Polyphenols are antioxidant compounds present in foods as cereals, fruits (peels, seeds and juice), vegetables, wine, and among others. Polyphenols are responsible to protect cells and to limit the risks of degenerative and tumoral diseases, as well as, to prevent cardiovascular diseases, neuronal diseases, and present important anti-inflammatory effects. The purpose of this study was to isolate polyphenols from pomegranate juice using solvents without heating. The solvents used were ultrapure water, ethanol, ethanol 70% and methanol. The samples were characterized by FTIR to evaluate the physical-chemical properties, the total polyphenols content was quantified by Folin-Ciocalteau method, using gallic acid as standard equivalent, and the total anthocyanins content was quantified by pH-differential method, using anthocyanins (cyanidin-3-glucoside) as standard equivalent. FTIR spectra showed the main characteristic groups of polyphenols, as hydroxyl group and stretching vibration of benzene rings. And the characteristic groups of solvents were CH<sub>2</sub> ou CH<sub>3</sub>, hydroxyl, carboxyl e carbonyl group. For the quantification of total polyphenols and anthocyanins content, the best results were found to the pomegranate juice: ultrapure water samples. According to the data obtained it was possible to conclude, who the process employed was effective to isolate the polyphenols from pomegranate juice and the use of different types of solvent influenced in the achievement of these results.

Keywords: Pomegranate juice; Polyphenols; Anthocyanins.

### RESUMO

Romã (*Punica granatum L.*) é uma fonte de polifenóis como as antocianinas, punicalagina, elagitaninos e taninos. Os polifenóis são compostos antioxidantes presentes em comidas como cereais, frutas (casca, sementes e suco), vegetais, vinho e entre outros. Polifenóis são responsáveis por proteger as células e limitar os riscos de doenças degenerativa e tumoral, assim como, prevenir doenças cardiovasculares, doenças neuronais e apresentam importantes efeitos anti-inflamatórios. O objetivo desse estudo foi isolar polifenóis do suco da romã usando solventes sem aquecimento. Os solventes usados foram água ultrapura, etanol, etanol 70% e metanol. As amostras foram caracterizadas por FTIR para avaliar as propriedades físico-química, o teor total de polifenóis foi quantificado pelo método de Folin-Ciocalteau, usando o ácido gálico como equivalente padrão e o teor total de antocianinas foi quantificado pelo método de pH-diferencial, usando antocianinas (cianidina-3-glucosídeo) como equivalente padrão. Os espectros de FTIR mostraram os principais grupos característicos dos polifenóis, como grupo hidroxil e estiramento de vibrações de anéis de benzeno. E os grupos característicos para os solventes foram os grupos CH<sub>2</sub> ou CH<sub>3</sub>, hidroxil, carboxil e carbonil. Para quantificação do teor total de polifenóis e antocianinas, os melhores resultados foram encontrados para as amostras de suco de romã: água. De acordo com os dados obtidos foi possível concluir, que o processo empregado foi efetivo para isolamento dos polifenóis do suco da romã e que o uso de diferentes tipos de solvente influenciou na obtenção desses resultados.

Palavras-chave: Suco da romã; Polifenóis; Antocianinas.

#### **1 INTRODUTION**

Pomegranate (*Punica granatum L.*) belongs to family Punicaceae, being cultivated in subtropical and tropical region, the fruit has been used in many countries and cultures of the worldwide (PUTNIK et al., 2018; BASSIRI-JAHROMI; DOOSTKAM, 2019). The pomegranate fruit contains many arils (red pulp and seeds) separated by a membrane called of pericarp. Pomegranate (peel, seeds and juice) has a valuable source of polyphenols, such as punicalagin, ellagitannins, tannins, flavonoids, anthocyanins and among others (AMBIGAIPALAN; CAMARGO; SHAHIDI, 2016; BASSIRI-JAHROMI; JAHROMI; DOOSTKAM, 2019).

Polyphenols are originated from metabolism secondary of plants acting as an antipathogenic agent and contributing to pigmentation, and they are responsible for colour, astringency, aroma and oxidative stability (NACZK; SHAHIDI, 2004; MARTÍN et al., 2017). In our diets, the polyphenols are the most abundant antioxidants present in vegetables, cereals, teas,

wines, and fruits such as orange, tangerine, cherry, grapes, blueberries and pomegranate (D'ARCHIVIO et al., 2007; FREITAS, 2019).

Chemically, the polyphenols present several hydroxyl groups on aromatic rings. Thus, polyphenols are classified by classes, according to number of phenol rings and structural elements to bind these rings. Thereby, the main polyphenols groups are phenolic acids, flavonoids, stilbenes and lignans (MARTÍN et al., 2017). Figure 1 describe the flowchart of classes and sub-classes of polyphenols.



Figure 1. Flowchart of classification of polyphenols based in the types of phenolic phytochemicals.

Anthocyanins belong to flavonoids class, being the largest group of water-soluble pigments (SHAIDI; NACZK, 2005). Basically, the structural chemical of anthocyanins is formed by benzene rings bonds (C6-C3-C6) who differ by number, position and hydroxylation and methoxylation degree of rings. In literature, there are six main anthocyanins described, being cyanidin, delphinidin, malvidin, peonidin, pelargonidin and petunidin (DELGADO-VARGAS; JIMENEZ; PAREDES-LOPEZ, 2010).

Anthocyanins from pomegranate has bioactive properties, although these properties may be varying according to cultivation type, growing, location, climate, and the maturity at harvest. In literature, the pomegranate is considered the healthy food, due its benefits and high antioxidants content. The mains medicinal properties related are antioxidant activity, wound healing, antidiabetic, antitumoral, anti-inflammatory, antimicrobial, and cardiovascular protective effect against low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), and atherosclerosis (AVIRAM; ROSENBLAT, 2013; NASCIMENTO JÚNIOR et al., 2016; PUTNIK et al., 2018).

The purposes of this study was to isolate polyphenols from pomegranate juice using solvents applied mechanical agitation followed by centrifugation without heating. The solvents used were ultrapure water, ethanol, ethanol 70%, and methanol. The samples were characterized by FTIR to evaluate the physical-chemical properties. Total polyphenols content was quantified by folin-ciocalteau method, using gallic acid as standard equivalent and the total anthocyanins content was analysed by pH-differential method, using anthocyanins (cyanidin-3-glucoside) as standard equivalent. Total polyphenols and anthocyanins content were evaluate using spectrophotometric methods.

### 2 MATERIALS AND METHODS

#### 2.1 MATERIALS

Pomegranate (*Punica granatum L.*) (Harvest in Sorocaba, São Paulo, Brazil), ethanol (Synth, São Paulo, Brazil), ultrapure water (18,2 M $\Omega$ .cm<sup>-1</sup>), and methanol (Chemco, São Paulo, Brazil) were used to obtain the samples. Gallic acid (Dinâmica, São Paulo, Brazil), folin-ciocalteau reagent (Dinâmica, São Paulo, Brazil) and sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) were used to total polyphenols content. Potassium chloride (Dinâmica, São Paulo, Brazil) and sodium acetate (Dinâmica, São Paulo, Brazil) were used to quantified total anthocyanins content. All reagents used was analytical grade.

#### 2.2 OBTAINING OF POMEGRANATE JUICE (Punica granatum L.)

Pomegranate was harvested from tree located in Sorocaba (São Paulo, Brazil) before complete maturation. After manual harvesting, the fruit were transported to Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology (LaBNUS). Figure 2 showed the pomegranate fruit portions. In this study was used the arils (red pulp and seeds), to obtain the pomegranate juice. Briefly, the fruits were selected and washed with water to remove impurities. And thus, manually were cut to separate the peels and arils. The pomegranate juice was obtained by compressed of arils, and after this process, the juice was stored in freezer (-18 °C).

 Wole Pomegranate
 Pels and Arils
 Arils (red pulp and seeds)

## 2.3 POLYPHENOLS ISOLATED FROM POMEGRANATE JUICE (PUNICA GRANATUM L.)

Polyphenols isolated from pomegranate juice was performed using four types different of solvents. Briefly, the samples were prepared in the proportion 1:10 (sample: solvent), and the solvents used were ultrapure water, ethanol (99.5%), ethanol 70% and methanol. The sample: solvent (v/v) were agitated by orbital shaker (Tecnal, TE-4200, Piracicaba, Brazil) in 100 rpm at 25 °C during 60 minutes, and in sequence, the samples were centrifuged (Celm, Combate, Barueri, Brazil) in 3.400 rpm (2.232 g-force) during 30 minutes. After this process, the supernatant was collected and stored in freezer (-18 °C).

#### 2.4 FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY (FTIR)

FTIR (IRAffinity-1S. Shimadzu, Kyoto, Japan) analysis was used to determine the chemical interaction between pomegranate juice and solvents. The characterization of specific chemical groups was evaluated by FTIR using the attenuated reflectance technique (FTIR-ATR) in the transmittance mode. Spectra were obtained in the wavelength range from 4000 to 600 cm<sup>-1</sup>, with a resolution of 4 cm<sup>-1</sup> and 128 scans. The results were collect using Labsolutions Software. The spectra were normalized, and the vibration bands were associated with the main chemical groups of each component of the samples.

#### 2.5 ANALYTICAL CURVE TO DETERMINE TOTAL POLYPHENOLS CONTENT

Total polyphenols content was determined by folin-ciocalteau method, described by Çam; İçyer (2013) and Fawole; Opara (2016) with modifications. For the quantification, the gallic acid was used as standard equivalent. The stock solution was prepared by dissolution aqueous of gallic acid (5 wt.%). Further dilutions were also performed in ultrapure water to obtain the calibration curve, in concentration range of 50-400  $\mu$ g/mL. After this preparation, in each dilution was collect 500  $\mu$ L and transferred in a glass test tube and added 2.5 mL of folin-ciocalteau reagent and 2.0 mL of sodium carbonate. The mixture was incubated for 15 min. in a thermostatic bath (Brookfield, TC 550, Middleborough, USA) at 50 °C and fast cooled in a freezer at -18 °C for 5 min.

The calibration curve had obtained by interpolation method, which unequivocally related to the analyte concentration, with the corresponding analytical signal at 760 nm ( $\lambda$ ), resulting from a linear relationship. The coordinates between at least two points on the straight line was defined as the set of points, whose coordinates satisfied the linear equation. The calibration curve had carried out in triplicate on seven points. To interpolation of signal with analyte concentration was used spectrophotometer (Femto 800XI, São Paulo, Brazil).

Figure 2. Whole pomegranate and pomegranate portions (peels and arils).

#### 2.6 TOTAL POLYPHENOLS CONTENT

Total polyphenols content was evaluated according to the folin-ciocalteau method. Briefly, the samples of 50  $\mu$ L were dispersed in 2.5 mL of folin-ciocalteau reagent (2:10) and 2.0 mL of sodium carbonate (7.5%). The samples were maintained at 50 °C in thermostatic bath, and in sequence, cooled in freezer (-18 °C) for 5 min. The samples were analyzed in triplicate and the total polyphenols content was determined at wavelength ( $\lambda$ ) of 760 nm by spectrophotometer, using FemtoScan Software. The results were expressed as  $\mu$ g of gallic acid equivalents (GAE) per mL of samples.

### 2.7 TOTAL ANTHOCYANINS CONTENT

Total anthocyanins content was evaluated according by the pH-differential method described by Lee; Durst; Wrolstad (2005) and Ambigaipalan; Camargo; Shahidi (2016) with slights modifications. The samples of 0.5 mL were dispersed in 9.5 mL of 0.025 M potassium chloride buffer (pH 1.0) and 0.4 M sodium acetate buffer (pH 4.5), separately. After 20 min, the samples were analysed in triplicate at 520 and 700 nm by spectrophotometer, using FemtoScan Software. The results of anthocyanins (cyanidin-3-glucoside) content were expressed in µg per mL of sample, being calculated according to Eq. (1).

$$C (mg/L) = \frac{[(A520 - A700) pH 1.0 - (A520 - A700) pH 4.5].MM.DF.10^{3}}{\epsilon . 1}$$
(1)

Where C (mg/L) represents total anthocyanins (cyanidin-3-glucoside) content, A is absorbance, MM is molecular weight of cyanidin-3-glucoside (449.2 g/mol), DF is dilution factor,  $10^3$  is used to conversion from gram to milligram,  $\varepsilon$  is molar absorptivity (26.900), and 1 is de path length (1 cm).

#### 2.8 STATISTICAL ANALYSIS

All data were presented with the mean values  $\pm$  standard deviation (SD). The data obtained were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey analysis. The test was performed using 95% of confidence interval. A two-sided P value of <0.05 was considered significant.

### **3 RESULTS AND DISCUSSION**

#### 3.1 POLYPHENOLS ISOLATED FROM POMEGRANATE JUICE (PUNICA GRANATUM L.)

Polyphenols isolated from pomegranate juice was carried out with liquid-liquid samples (1:10). The liquid-liquid is a process to separate the components, due its distribution between two liquid phases. This process can be occurs, when the transfer of mass from one liquid phase into second liquid phase, this method may be performed in many different ways (ROBBINS; CUSACK, 1999; MARTÍN et al., 2017).

Therefore, in this study the method applied was the liquid-liquid process without heating, associating mechanical agitation, followed by centrifugation. Thereby, the centrifugation method act as sorting out of mixture, causing the suspended particles to tend to sedimentary (sedimentation process), and this is due to the difference in density, influenced by the centrifuge acceleration (g-force) that is employed in samples (ANLAUF, 2007). This sedimentation process that occurs can be seen in Figure 3 (B).

Figure 3 shown the samples of pomegranate juice (A) before and (B) after the polyphenols isolate process. Polyphenols isolate from pomegranate juice was performed using different solvents, being ultrapure water, methanol, ethanol 70%, and ethanol (99.5%).

**Figure 3.** Samples of pomegranate juice (A) before and (B) after polyphenols isolate process. The number identify the samples, being (1) Pomegranate juice: ultrapure water; (2) Pomegranate juice: methanol; (3) Pomegranate juice: ethanol 70%, and (4) Pomegranate juice: ethanol (99.5%).



### 3.2 FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY (FTIR)

The mid-infrared spectrometer was used to analyse the fundamental vibration energy linked rotational-vibrational that attached to interaction of infrared radiation between pomegranate juice samples. Infrared spectra were analysed in graph with FTIR in transmittance mode. The Figure 4 shows the samples of pomegranate juice with ultrapure water, ethanol (99.5%), ethanol 70%, and methanol.

**Figure 4.** FTIR spectra in samples of polyphenols isolated pomegranate juice. All spectra were obtained at 23±1°C (room temperature).



The two characteristic peaks of pomegranate shown in the FTIR spectra (Figure 4) in pomegranate juice: ultrapure water. The 3421 cm<sup>-1</sup> peak was corresponding hydroxyl group (-OH) and 1651 cm<sup>-1</sup> peak was related to C=C stretching vibration of benzene rings (black dashed line) (EDISON; SETHURAMAN, 2013; OLIVEIRA et al., 2016), these peaks indicate the presence of polyphenols in pomegranate juice: ultrapure water samples.

Pomegranate juice: ethanol (99.5%) sample was observed characteristics peaks of ethanol and an intensity reduction between 1650-1600 cm<sup>-1</sup> of C=C group (black dashed line). The region between 3371-3419 cm<sup>-1</sup> was related to -OH group, the peak in 3000-2980 cm<sup>-1</sup> were related to stretching vibration of CH<sub>2</sub> or CH<sub>3</sub> groups (OMEROGLU AY et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016), and the 1200-900 cm<sup>-1</sup> bands were observed frequencies specific of C-O bonds (red dashed line) (COLDEA et al., 2013).

While in pomegranate juice: ethanol 70% sample in 3419 cm<sup>-1</sup>, 2982 cm<sup>-1</sup> and 1649 cm<sup>-1</sup> corresponding, respectively, stretching vibration of hydroxyl group, CH<sub>2</sub> or CH<sub>3</sub> and stretching vibration of C=C (black dashed line) was similar with pomegranate juice: ultrapure water sample (OMEROGLU AY et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016). And peaks observed between 1200-900 cm<sup>-1</sup> bands were specific stretching of C-O bonds (red dashed line) (COLDEA et al., 2013).

Pomegranate juice: methanol sample was observed characteristics peaks of methanol and an intensity reduction between 1650-1600 cm<sup>-1</sup> of C=C group (black dashed line). The peak found were resemble with methanol, as described by Coldea et al., (2013) and Rizwana; Alwhibi; Soliman (2016). Peak obtained at 3358 cm<sup>-1</sup> represents hydroxyl group, the CH and CH<sub>2</sub> stretching were observed at 2943 cm<sup>-1</sup> and 2833 cm<sup>-1</sup>, and the peak at 1028 cm<sup>-1</sup> represents C-O stretch (red dashed line).

### 3.3 ANALYTICAL CURVE TO DETERMINE TOTAL POLYPHENOLS CONTENT

Analytical curve (Figure 5) was developed to determine total polyphenols content. The linearity was obtained between 50-400  $\mu$ g/mL, corresponding to absorbance values between 0.01 and 0.6. The correlation coefficient was of 0,998 and linear equation obtained was y=0,0017x - 0,0832. The calibration curve is an empirical equation that relates the response of a specific instrument to the concentration of specific sample analyse. The analytical method obtained by spectrophotometer to determine polyphenols content was simple, reliable, easy to perform, reproducible and low-cost (BLAINSKI; LOPES; MELLO, 2013).

Figure 5. Analytical curve to determine total polyphenols content in samples of polyphenols isolated from pomegranate



### 3.4 TOTAL POLYPHENOLS CONTENT

Total polyphenols content of samples were evaluated by folin-ciocalteau method. This colorimetric method relies in the reduction of phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent, due the transfer of electrons in alcaline medium of polyphenols to obtain blue complexes able to read by spectrophotometer (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Total polyphenols content (Figure 6) was performed to analyze the polyphenols isolate from pomegranate juice using different types of solvents. The results were expressed as  $\mu g$  of gallic acid equivalents (GAE) per mL of samples. The results of total polyphenols content in pomegranate juice samples were different statistically (p>0.05). The results of samples showed who higher value was found to pomegranate juice: ultrapure water, followed by pomegranate juice: ethanol, pomegranate juice: methanol and pomegranate juice: ethanol 70%.

Figure 6. Total polyphenols content in samples of polyphenols isolated from pomegranate juice.



Note: PJ - Pomegranate juice. Equal letters (for the same analysis) indicate that there is no significant difference between the mean values (p>0.05) (n=3).

### 3.5 TOTAL ANTHOCYANINS CONTENT

Total anthocyanins content of samples were evaluated by pH-differential method. The pH is crucial factor that influence in the colouring of anthocyanins, due the anthocyanins may be different colour and structural form. The difference of absorbance obtained, in this method to promote infer the real anthocyanins fraction present in samples (TEIXEIRA; STRINGHETA; OLIVEIRA, 2008; BORDIGNON JR. et al., 2009). Total anthocyanins content (Figure 7) was performed to determine the polyphenols isolate from pomegranate juice using different types of solvents. The results of anthocyanins (cyanidin-3-glucoside) content were expressed in  $\mu$ g per mL of sample. The higher result was found to pomegranate juice: ultrapure water, followed by pomegranate juice: methanol, pomegranate juice: ethanol 99.5% and pomegranate juice: ethanol 70%. The samples of pomegranate juice with methanol, ethanol (99.5%), and ethanol 70% were similar statistically (p<0.05), being different statistically (p>0.05) to pomegranate juice: ultrapure water.



Figure 7. Total anthocyanins content in samples of polyphenols isolated from pomegranate juice.

Note: PJ - Pomegranate juice. Equal letters (for the same analysis) indicate that there is no significant difference between the mean values (p>0.05) (n=3).

Table 1 present values (mean  $\pm$  SD) of total polyphenols content *versus* total anthocyanins content in samples of polyphenols isolate from pomegranate juice. When correlated the results of total polyphenols and anthocyanins content, in the samples of pomegranate juice: ultrapure water was found 12% of total anthocyanins content, 11.5% to ethanol 70%, and 10% to ethanol (99.5%) and methanol. Therefore, the sample of pomegranate juice: ultrapure water presented higher result to total anthocyanins content.

 Table 1. Results of total polyphenols content versus total anthocyanin content in samples of polyphenols isolated from pomegranate juice.

Samples	Total polyphenols content	Total anthocyanins content	
	(µg/mL)	(µg/mL)	
PJ: ultrapure water	429,05±0,75 °	51,77±2,99 ª	
PJ: ethanol	423,01±1,29 <sup>b</sup>	43,42±4,98 <sup>b</sup>	
PJ: ethanol 70%	319,16±0,75 °	36,92±4,99 <sup>b</sup>	
PJ: methanol	420,43±4,66 <sup>d</sup>	48,43±2,97 <sup>b</sup>	

Note: PJ - Pomegranate juice. Equal letters (for the same analysis) indicate that there is no significant difference between the mean values (p>0.05) (n=3).

The different results found in the analysis to FTIR (Figure 4), total polyphenols content (Figure 6) and total anthocyanins content (Figure 7), may be attributed to type of solvents used to promote the process of polyphenols isolated from pomegranate juice, due the solubility of polyphenols vary according to, the polarity of the solvents, the degree of polymerization of polyphenols and their interactions with other constituents of pomegranate juice (*Punica granatum L.*). The solvents most used, described in literature, were water, methanol or acidified methanol, acetone, ethanol and their combination (NACZK; SHAHIDI, 2004; ANGELO; JORGE, 2006; WANG, 2011).

The compound solubility in solvent system depends on of structural characteristic of each molecule polar and apolar portion present in structure. Thus, molecules with a higher apolar ratio or poorly soluble in water decrease water solubility, thereby, its do not easily form hydrogen bonds. However, the polarity and dielectric constant is a crucial factors to improve the solubility, due its be a parameter that influences the dissolution process (GREMIÃO; CASTRO, 1999; MEDEIROS; KANIS, 2010).

According to Gremião; Castro (1999), in our study, the dielectric constant at 20 °C were 25, 33.6, 41.6 and 80.4, respectively, to ethanol, methanol, ethanol 70% and water. Therefore, the better results of total polyphenols and anthocyanins content was found to pomegranate juice: ultrapure water, being the water the solvent with higher value of dielectric constant. Other factors that also influenced the process of polyphenols isolated from pomegranate juice in food are chemical nature, isolation method, sample particle size, storage time and conditions, thereby, the presence of interfering substances. The chemical nature of polyphenols vary from simple to highly polymerized substances, that include varying proportions of phenolic acids, phenylpropanoids, anthocyanins, tannins and among others substances (GREMIÃO; CASTRO, 1999; SHAIDI; NACZK, 2005).

Anthocyanins belong to a class of natural compounds known as flavonoids who also include flavones and isoflavones, who are formed via condensation of phenylpropane (C6-C3) compound. The anthocyanins constitute the largest group of water-soluble pigments in the plant kingdom, being present in tissues of higher plants, from leaves, stems, roots, flowers and fruits (peel, seeds and juice) (SHAIDI; NACZK, 2005; KHOO et al., 2017; FREITAS, 2019).

The chemical structural basic of anthocyanins (aglycone) is formed by C6-C3-C6. There are described, in literature, 17 types of anthocyanins who differ in the number, position and hydroxylation and methoxylation degree of rings, but six main of them are the most commonly described, being cyanidin, delphinidin, malvidin, peonidin, pelargonidin and petunidin (DELGADO-VARGAS; JIMENEZ; PAREDES-LOPEZ, 2010), these six main anthocyanins are described in Figure 8.

Figure 8. Chemical structure of the six main anthocyanins (cyanidin, delphinidin, malvidin, peonidin, pelargonidin and



According to Freitas (2019) the composition of anthocyanins are present in plants, foods and fruit (peel, seeds and juice), in general, beside this are described some specifically anthocyanins to some fruits. The cyanidin was found isolated in apples, figs and peach. Delphinidin in eggplant and pomegranate and some fruits have two or more types of anthocyanins as cherry, grapes and blueberries.

Anthocyanins-rich food are higher consumed due the potential antioxidant, therefore, it is having been widely studied and used in medicine for treat several diseases. Anthocyanins possess antidiabetic, anticancer, anti-inflammatory and antimicrobial effect. In the cardiovascular disease, the pomegranate are considered a healthy fruit, because have antioxidants agents to protecting low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) from oxidation, attenuates atherosclerosis development and decrease the blood pressure (AVIRAM; ROSENBLAT, 2013; KHOO et al., 2017).

Nascimento Jr. et al., (2016) described the use of pomegranate (*Punica granatum L*.) to promote the healing action of stomatitis induced by burns on the tongue of rats. The rats were treated with pomegranate juice by gavage (G1), pomegranate juice by gavage associated with local application of pomegranate peel tea (G2), and only local application of pomegranate peel tea (G3). And it was found that after 14 days, the G2 group showed the better results. Thus, confirming the findings who the pomegranate (*Punica granatum L*.), also has a healing action on the lingual mucosa of rats.

On the other hand, structurally the anthocyanins (Figure 8) present interest due its composition. Specifically, in the hydroxyl (-OH) terminal, for being attractive to acting as cross-linking agent. However, in literature, there are no studies who related anthocyanins as crosslinker effect in extracellular matrix (e.g. collagen) or biological devices, but there are some structural characteristics who evidence this potential. Cross-linking agent may be classified as chemical cross-linking agent
(e.g. epoxy compounds, diphenylphosphoryl azide (DPPA) and glutaraldehyde) or natural cross-linking agent (e.g. genipin and proanthocyanidins). The cross-linking process can have chemical, physical, or biological approaches, and both are able to connect the group functional of polymers chain to another one through covalent, ionic or hydrogen bond (ORYAN et al., 2018; ALVES et al., 2019).

Although of use both cross-linking (chemical or natural), the natural cross-linking agent have more advantage, because its biocompatible and present low cytotoxic effect to clinical applicability (CHOI; KIM; MIN, 2016; ALVES et al., 2019). Thereby, some studies presented results using a natural cross-linking agent (ZHAI et al., 2013; PINHEIRO et al., 2015; VIDAL et al., 2016; WEI et al., 2018). Song et al., (2018) described the use of genipin as crosslinker to *in situ* formation of injectable hydrogel of chitosan-gelatine for sustained intraocular drug delivery. The use of proanthocyanidins were described by Choi; Kim; Min, (2016) and Alves et al., (2019) to promote crosslinker effect in scaffold to application in medicine regenerative.

## **4 CONCLUSION**

According to set of results findings it concludes who, the technique employed to isolate polyphenols from pomegranate juice (*Punica granatum L.*) by liquid-liquid process using solvent method, and the quantification of total polyphenols and anthocyanins content were effective and satisfactory. In the study, it may conclude that the solvents used influenced in directly in process, being confirmed in the results of FTIR, total polyphenols content and total anthocyanins content. Thus, in the results were observed who sample obtained with ultrapure water (pomegranate juice: ultrapure water) showed the better results. Although the method applied is satisfactory and effective to isolation, the results may be optimized to future applications. The use of anthocyanins have been widely studied, due the significant results in disease treatment, presented the potential to antioxidants effect, anti-inflammatory effect, preventing cardiovascular diseases and neurodegenerative diseases.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study had financial support from University of Sorocaba (UNISO) and CAPES/PROSUC-Brazil.

## REFERENCES

ALVES, T. et al. Dense lamellar scaffold, biomimetically inspired, for reverse cardiac remodeling: Effect of proanthocyanidins and glutaraldehyde. Journal of Dispersion Science and Technology, p. 1–14, 2019.

AMBIGAIPALAN, P.; CAMARGO, A. C. DE; SHAHIDI, F. Phenolic Compounds of Pomegranate Byproducts (Outer Skin, Mesocarp, Divider Membrane) and Their Antioxidant Activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 64, n. 34, p. 6584–6604, 2016.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2006.

ANLAUF, H. Recent developments in centrifuge technology. Separation and Purification Technology, v. 58, n. 2, p. 242–246, 2007.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M. Pomegranate for Your Cardiovascular Health. Rambam Maimonides Medical Journal, v. 4, n. 2, p. e0013, 2013.

BASSIRI-JAHROMI, S.; DOOSTKAM, A. Comparative evaluation of bioactive compounds of various cultivars of pomegranate (Punica granatum) in different world regions. **AIMS Agriculture and Food**, v. 4, n. 1, p. 41–55, 2019.

BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. DE. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from limonium brasiliense L. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6852–6865, 2013.

BORDIGNON JR., C. L. et al. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. Ciencia e Tecnologia de Alimentos, v. 29, n. 1, p. 183–188, 2009.

ÇAM, M.; İÇYER, N. C. Phenolics of pomegranate peels: extraction optimization by central composite design and alpha glucosidase inhibition potentials. Journal of Food Science and Technology, v. 52, n. 3, p. 1489–1497, 2013.

CHOI, Y.; KIM, H.-J.; MIN, K.-S. Effects of proanthocyanidin, a crosslinking agent, on physical and biological properties of collagen hydrogel scaffold. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 41, n. 4, p. 296, 2016.

COLDEA, T. E. et al. Rapid quantitative analysis of ethanol and prediction of methanol content in traditional fruit brandies from romania, using FTIR spectroscopy and chemometrics. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 41, n. 1, p. 143–149, 2013.

D'ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Annali dell'Istituto Superiore di Sanita, v. 43, n. 4, p. 348–361, 2007.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMENEZ, A. R.; PAREDES-LOPEZ, O. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. In: Critical Reviews in Food Science and Nutrition. p. 173–289, 2010.

EDISON, T. J. I.; SETHURAMAN, M. G. Biogenic robust synthesis of silver nanoparticles using Punica granatum peel and its application as a green catalyst for the reduction of an anthropogenic pollutant 4-nitrophenol. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 104, p. 262–264, 2013.

FAWOLE, O. A.; OPARA, U. L. Stability of total phenolic concentration and antioxidant capacity of extracts from pomegranate co-products subjected to in vitro digestion. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2016.

FREITAS, V. O mundo colorido das antocianinas. Revista de Ciência Elementar, v. 7, n. 2, p. 1-6, 2019.

GREMIÃO, M. P. D.; CASTRO, A. D. Considerações sobre o processo de dissolução na preparação de dispersões moleculares. Infarma - Ciências Farmacêuticas, v. 9, n. 1/5, p. 7–11, 1999.

KHOO, H. E. et al. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food and Nutrition Research**, v. 61, n. 1, p. 1–21, 2017.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1269–1278, 2005.

MARTÍN, J. et al. Anthocyanin Pigments: Importance, Sample Preparation and Extraction. In: **Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications**. p. 117–152, 2017.

MEDEIROS, J. DE; KANIS, L. A. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de Mikania glomerata Spreng., Asteraceae, e Passiflora edulis Sims, Passifloraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 796–802, 2010.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A, v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, 2004.

NASCIMENTO JÚNIOR, B. J. et al. Estudo da ação da romã (Punica granatum L.) na cicatrização de úlceras induzidas por queimadura em dorso de língua de ratos Wistar (Rattus norvegicus). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 423–432, 2016.

OLIVEIRA, R. N. et al. Análise por FTIR e quantificação de fenóis e flavonóides de cinco produtos naturais disponíveis comercialmente utilizados no tratamento de feridas. **Revista Materia**, v. 21, n. 3, p. 767–779, 2016. ÖMEROĜLU AY, Ç. et al. Characterization of Punica granatum L. peels and quantitatively determination of its biosorption behavior towards lead(II) ions and Acid Blue 40. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 100, p. 197–204, 2012.

ORYAN, 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, 2018.

PINHEIRO, A. et al. Comparison of natural crosslinking agents for the stabilization of xenogenic articular cartilage. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 34, n. 6, p. 1037–1046, 2015.

PUTNIK, P. et al. Comparing the effects of thermal and non-thermal technologies on pomegranate juice quality: A review. Food Chemistry, v. 279, p. 150–161, 2018.

RIZWANA, H.; ALWHIBI, M. S.; SOLIMAN, D. A. Antimicrobial activity and chemical composition of flowers of Matricaria aurea a native herb of Saudi Arabia. **International Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 6, p. 576–586, 2016.

ROBBINS, L. A.; CUSACK, R. W. Liquid-liquid extraction operations. In: Perry's chemical engineers' handbook. p. 15-1-15-48, 1999.

SHAIDI, F.; NACZK, M. Analysis of polyphenols in foods. In: Methods of analysis of food components and additives. p. 199-259, 2005.

SONG, Y. et al. In situ formation of injectable chitosan-gelatin hydrogels through double crosslinking for sustained intraocular drug delivery. **Materials Science and Engineering C**, v. 88, n. March, p. 1–12, 2018.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v. 55, n. 4, p. 297–304, 2008.

VIDAL, C. M. P. et al. Collagen-collagen interactions mediated by plant-derived proanthocyanidins: A spectroscopic and atomic force microscopy study. Acta Biomaterialia, v. 41, p. 110–118, 2016.

WANG, Z. Extract of Phenolics From Pomegranate Peels. The Open Food Science Journal, v. 5, n. 1, p. 17–25, 2011.

WEI, Y. et al. Integrated oxidized-hyaluronic acid/collagen hydrogel with  $\beta$ -TCP using proanthocyanidins as a crosslinker for drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, 2018.

ZHAI, W. et al. Crosslinking of saphenous vein ECM by procyanidins for small diameter blood vessel replacement. Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials, v. 102, n. 6, p. 1190–1198, 2013.