

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**TRATAMENTO *IN SITU* DE LESÃO MEDULAR UTILIZANDO
NANOFORMULAÇÃO FOTOPOLIMERIZÁVEL CONTENDO
ISOFLAVONOIDES**

GABRIELLE BARROZO NOVAIS

Aracaju
Novembro – 2022

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**TRATAMENTO *IN SITU* DE LESÃO MEDULAR UTILIZANDO
NANOFORMULAÇÃO FOTOPOLIMERIZÁVEL CONTENDO
ISOFLAVONOIDES**

Tese de Doutorado submetida à banca
examinadora para a obtenção do título de
Doutora em Saúde e Ambiente, na área de
concentração Saúde e Ambiente.

GABRIELLE BARROZO NOVAIS

Orientador(es)

Profa. Dra. Juliana Cordeiro Cardoso
Profa. Dra. Margarete Zanardo Gomes

Aracaju
Novembro – 2022

Novais, Gabrielle Barrozo

N936t Tratamento *IN SITU* de lesão medular utilizando nanoformulação fotopolimerizável contendo isoflavonoides/ Gabrielle Barrozo Novais; orientação [de] Prof.^a Dr^a Juliana Cordeiro Cardoso; Prof.^a Dr^a Margarete Zanardo Gomes – Aracaju: UNIT, 2022.

96 f. il; 30 cm

Tese (Doutorado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2022

1. Própolis vermelha. 2. Antioxidante. 3. Anti-inflamatória I. Novais, Gabrielle Barrozo. II. Cardoso, Juliana Cordeiro (orient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

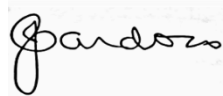
CDU: 616.832

TRATAMENTO *IN SITU* DE LESÃO MEDULAR UTILIZANDO NANOFORMULAÇÃO FOTOPOLIMERIZÁVEL CONTENDO ISOFLAVONOIDES

Gabrielle Barrozo Novais

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:



Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.
Orientadora



Margarete Zanardo Gomes, D.Sc.
Orientadora



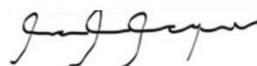
Charles dos Santos Estevam, Dr.
Universidade Federal de Sergipe



Giancarlo Richard Salazar Banda, Dr.
Universidade Tiradentes



Edna Aragão Farias Cândido, Dr.
Universidade Tiradentes



Maria Nogueira Marques, Dr.
Universidade Tiradentes

Aracaju
Novembro - 2022

DEDICATÓRIA

Dedico esse Doutorado ao meu Deus de aliança que nunca me deixou desistir...

Minha família que tanto amo...

Meus mentores de luz...

Minhas orientadoras por todo apoio...

EPÍGRAFE

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar
agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus todo poderoso, por toda força e determinação para correr atrás dos meus sonhos.

Aos meus pais e familiares que sempre me apoiaram e me incentivaram. Amo muito vocês!

Ao meu marido André e minha filha Rafaelle, por suportarem minha ausência diária, por acreditarem em mim e no meu potencial. Minha vida é muito mais bonita com vocês.

A minha sogra Dilma e também a tia Diene por cuidarem tão bem da minha pequena, durante todo período de ausência. Meus sinceros agradecimentos!

Agradeço a todos os Mestres (as) e Doutores (as) que passaram pela minha jornada e contribuíram de forma positiva para o meu crescimento profissional! Hoje com toda certeza, carrego um pouco de cada um de vocês.

Agradeço a professora Edna Aragão por ter sido minha porta de referência e entrada no mundo científico, sou e sempre serei grata.

Ao meu professor, amigo e exemplo de ser humano Ricardo. Saiba que admiro muito você... Um homem sábio, caráter sem igual, te amo professor!

Às minhas orientadoras Juliana e Margarete... Vocês são fonte de saber! Juliana é um doce de pessoa, mulher incrível, sabia, amiga, sempre pronta para ajudar todos os alunos. Margarete é uma mulher de pulso, forte e ao mesmo tempo decidida e dedicada. Levarei de vocês um pouco de cada, me tornei uma mulher forte que não corre dos obstáculos e isso devo a vocês... Cada uma de vocês me mostrou e me tornou a Gabrielle que sou hoje, levarei de vocês cada lembrança, cada conversa, cada discussão científica e até mesmo cada bronca, necessária para o meu aprendizado. Amo vocês demais! Agora chegou o momento dessa filha voar e partilhar todo o conhecimento que obteve de vocês. Meu muito obrigada!

Aos amigos verdadeiros que construir nessa jornada, que não foram poucos! Em especial Allef, Thiga, Nelly, Eliane, Fani, Tessy, Carlisson, Robertta e Camila. Amo muito vocês!

Aos amigos da família LMPE, Lbmat e LNMED...

Aos meus alunos de iniciação científica pela paciência e apoio, durante toda jornada...

Aos vários funcionários da UNIT-ITP que animaram meus dias... Em especial Cris, Júlio, Thayse, Cleverton e Cristina.

Aos órgãos de fomento BNB (Banco do Nordeste) CNPq (Conselho Nacional de Conhecimento Científico e Tecnológico) CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPITEC-SE (Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino, Tecnologia e Cultura), por me proporcionarem recursos e bolsa de estudo, para que dessa forma, fosse possível me dedicar de forma exclusiva ao Programa de Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes.

A Universidade Tiradentes pelo suporte e formação e ao ITP por todos os experimentos desenvolvidos!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
CAPÍTULO 1	17
1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
1.1 Lesão da medula espinal (LME)	17
1.2 Tratamento imediato após LME.....	21
1.3 Novas abordagens para o tratamento da LME	22
1.3.1 Produtos naturais como agentes neuroprotetores	25
1.3.1.1 Própolis.....	26
1.3.1.2 Própolis vermelha (PV)	27
1.3.2 Biomateriais utilizados na neuroregeneração	28
1.3.2.1 Gelatina metacrilada GelMA	30
1.3.3 Nanotubos de carbono na neuroregeneração.....	32
REFERÊNCIAS.....	38
CAPÍTULO 2	45
NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE SIMPLES E DE PAREDE MÚLTIPLA FUNCIONALIZADOS POR ISOFLAVONAS	45
1 INTRODUÇÃO	45
2 MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1 Material.....	48
2.2 Funcionalização de nanotubos de carbono	48
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS	60
CAPÍTULO 3	64
NANOFORMULAÇÕES DE HIDROGÉIS FOTOPOLIMERIZÁVEIS CONTENDO NTCAPM- EHPV PARA O TRATAMENTO DE LESÃO MEDULAR <i>IN SITU</i> EM MODELO MURINO	64
1 INTRODUÇÃO	64
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	66
2.1 Material.....	66
2.2 Funcionalização de nanotubos de carbono	66
2.2.1 Oxidação do NTC	66

2.2.2	Ancoramento das isoflavonas presentes no EHPV no NTCAPM	67
2.3	Caracterização do NTCPM	67
2.3.1	Dispersão e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	67
2.3.2	Espectroscopia no infravermelho (FTIR).....	67
2.3.3	Espectroscopia Raman.....	68
2.3.4	Análise Térmica (TGA)	68
2.4	Formulação do hidrogel.....	68
2.4.1	Preparo do pré-polímero de GelMA	68
2.4.2	Preparo das formulações de GelMA	68
2.4.3	Preparo do hidrogel de GelMA por fotopolimerização e propriedades de intumescimento.....	69
2.5	Avaliação da efetividade <i>in vivo</i>	69
2.5.1	Procedimento cirúrgico para lesão medular	70
2.6	Protocolo de avaliação da função motora.....	70
2.7	Análise Estatística.....	71
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.1	Caracterização dos NTCPM	71
3.2	Caracterização das formulações.....	79
3.3	Ensaio biológico.....	82
4	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS	86
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
	ANEXOS	94

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Danos primários e secundários da LME.....	18
Figura 2. Compostos fenólicos como agentes neuroprotetores.....	25
Figura 3. Estruturas moleculares dos principais flavonoides encontrados no extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV).....	28
Figura 4. Preparo do pré-polímero.....	31
Figura 5. Formação dos hidrogéis.....	31
Figura 6. Tipos de geometrias das nanoestruturas dos nanotubos de carbono.....	33
Figura 7. Aplicações da nanotecnologia de acordo com as propriedades do material em escala nanométrica (YANG <i>et al.</i> , 2019).	35
Figura 8. Implante do hidrogel de gelatina metacrilada (GelMA) contendo nanotubo de carbono (NTC) funcionalizado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV) <i>in situ</i> em modelo de hemisseção bilateral da Medula espinal.	37

CAPÍTULO 2

Figura 1. A. Nanotubo de carbono de parede simples (NTCPS); B. Nanotubo de carbono de paredes múltiplas (NTCPM).....	47
Figura 2. Isoflavonas presentes no EHPV: biochanina A e formononetina.	48
Figura 3. Funcionalização de NTCPS e NTCPM com isoflavonas.....	49
Figura 4. Fotografias digitais dos nanotubos (NTC) de paredes múltiplas e simples antes e após o processo de oxidação-funcionalização dispersos em solução aquosa no pH 4,0 e 7,0. Legendas: NTCPM, NTC de paredes múltiplas; NTCAPM, NTCPM oxidados com ácido; NTCAPM-Ft, NTCAPM funcionalizados com formononetina; NTCAPM-BioA, NTCAPM funcionalizado com biochanina A; NTCPS, NTC de parede simples; NTCAPS, NTCPS oxidados com ácido; NTCAPS-Ft, NTCAPS funcionalizado com formononetina; NTCAPS-BioA, NTCAPS funcionalizado com biochanina A.	51
Figura 5. Imagens de MEV de NTCAPS, NTCAPS-Ft e NTCAPS-BioA na coluna da esquerda; NTCAPM, NTCAPM-Ft e NTCAPM-BioA na coluna da direita. Legendas: NTCPM, NTC de paredes múltiplas originais; NTCAPM, NTCPM tratados com ácido; NTCAPM-Ft, NTCAPM funcionalizado com formononetina; NTCAPM-BioA, NTCAPM funcionalizado com biochanina A; NTCPS, NTC de parede simples originais; NTCAPS, NTCPS tratados com ácido; NTCAPS-Ft, NTCAPS funcionalizado com formononetina; NTCAPS-BioA, NTCAPS funcionalizado com biochanina A.	52
Figura 6. Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) dos nanotubos de carbono. Legenda: BioA: Biochanina A; Ft: Formononetina; NTCAPS: nanotubo de carbono de parede simples após oxidação; NTCAPS-BioA e NTCAPS-Ft: NTCAPS funcionalizado com	

BioA ou Ft respectivamente; NTCAPM: nanotubo de carbono de parede múltipla após oxidação; NTCAPM-BioA e NTCAPM-Ft: NTCAPM funcionalizado com Bio-A ou Ft respectivamente. ANOVA seguidos de Tukey, comparação realizada entre amostras com o mesmo tipo de NTCA. * amostras NTCAPS-Ft e NTCA-BioA são significativamente diferentes de NTCAPS para $p < 0,0001$; ## NTCAPS-Ft é significativamente diferente de NTCAPS_BioA para $p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta$ NTCAPM-BioA e NTCAPM-Ft são significativamente diferentes de NTCAPM para $p < 0,001$; @@ NTCAPM-Ft é significativamente diferente de NTCAPM-BioA para $p < 0,01$ 53

Figura 7. Espectros FTIR de nanotubo de carbono de parede simples (lado esquerdo) e parede múltipla (lado direito), com suas respectivas ampliações. Legenda: BioA: Biochanina A; Ft: Formononetina; NTCAPS: nanotubo de carbono de parede simples após oxidação; NTCAPS-BioA e NTCAPS-Ft: NTCAPS funcionalizado com BioA ou FT respectivamente; NTCAPM: nanotubo de carbono de parede múltipla após oxidação; NTCAPM-BioA e NTCAPM-Ft: NTCAPM funcionalizado com Bio-A ou Ft respectivamente..... 55

Figura 8. Curvas termogravimétricas (1ª e 3ª linhas) e derivadas (2ª e 4ª linhas) de NTCAPS, NTCAPS-Ft e Ft (na coluna da esquerda - 1ª e 2ª linhas), NTCAPS, NTCAPS-BioA e BioA (na coluna direita - 1ª e 2ª linhas); NTCAPM, NTCAPM-Ft e Ft (na coluna da esquerda - 3ª e 4ª linhas); NTCAPM, NTCAPM-BioA e BioA (na coluna da direita - 3ª e 4ª linhas). Abreviaturas: NTCAPS: nanotubo de carbono de parede simples após oxidação; NTCAPS-BioA: NTCAPS após funcionalização com Biochanina A; NTCAPS-Ft: NTCAPS após funcionalização com Formononetina; NTCAPM: nanotubo de carbono de paredes múltiplas após oxidação; NTCAPM-BioA: NTCAPM após funcionalização com Biochanina A; NTCAPM-Ft: NTCAPM após funcionalização com Formononetina; Ft: formononetina; BioA: biochanina A..... 57

Figura 9. Perfil cromatográfico das amostras. Legendas: Ft, formononetina; BioA, biochanina A; NTCAPM-Ft, nanotubo de carbono de paredes múltiplas após oxidação com formononetina; NTCAPM-BioA, nanotubo de carbono de paredes múltiplas após oxidação usando Biochanina A. 59

CAPÍTULO 3

Figura 1. Dispersibilidade dos NTCPM em tampão fosfato pH 7,4 (1A) NTCPM (nanotubo de carbono de parede múltipla), (1B) NTCAPM (NTCPM após tratamento ácido), (1C) NTCAPM (ox) (NTCAPM tratado em ambiente oxidativo), (1D) NTCAPM-EHPV (NTCAPM tratado com EHPV), (1E) NTCAPM-EHPV (ox) (NTCAPM tratado com EHPV em ambiente oxidativo). . 72

Figura 2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das amostras (2A) NTCPM, (2B) NTCAPM, (2C) NTCAPM-EHPV, (2D) NTCAPM (ox), (2E) NTCAPM-EHPV (ox)..... 73

Figura 3. Espectros FTIR de NTCPM (nanotubo de carbono de parede múltipla), NTCAPM (NTCPM após tratamento com ácido), NTCAPM (ox) (NTCAPM submetido a um ambiente oxidativo), EHPV (extrato hidroetanólico de própolis vermelha), MF (mistura física de NTCPM

e EHPV), NTCAPM-EHPV (NTCPM tratado com EHPV), NTCAPM- EHPV (ox) (NTCAPM tratado com EHPV em ambiente oxidativo).....	74
Figura 4. Espectro Raman de NTCAPM (NTCPM após tratamento com ácido), EHPV (Extrato hidroetanólico de própolis vermelha) NTCAPM-EHPV (ox) (NTCAPM tratado com EHPV em ambiente oxidativo) NTCAPM- EHPV (NTCAPM tratado com EHPV) e MF (mistura física de NTCAPM e EHPV).....	76
Figura 5. Curvas termogravimétricas (perda de massa em %) e derivadas (DTG em %/min). Na parte superior da figura encontram -se os resultados das amostras de nanotubo de paredes múltiplas antes da oxidação (NTCPM) seguido do NTCPM oxidado com ácido nítrico e sulfúrico (NTCAPM) e do NTCAPM submetido à meio oxidante (peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico) após oxidação com ácidos (NTCAPM (ox)). Na parte central da figura encontram-se os resultados do extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV), e as amostras de NTCAPM funcionalizadas com EHPV na ausência de meio oxidante (NTCAPM-EHPV) e na presença (NTCAPM-EHPV (ox)). Na parte inferior encontram-se os resultados da mistura física do NTCAPM e EHPV (MF).	78
Figura 6. Influência dos volumes das formulações em relação ao tempo de exposição à radiação UV.....	80
Figura 7. Perfil de intumescimento das amostras de GelMA (hidrogel de gelatina metacrilada 10%), GelMA-NTCAPM (hidrogel de GelMA contendo nanotubo de carbono), GelMA-NTCAPM (ox) (hidrogel de GelMA-NTCAPM obtido em meio oxidante) GelMA-EHPV (GelMA contendo extrato hidroetanólico de própolis vermelha 0,1%); GelMA-NTCAPM-EHPV (GelMA contendo NTCAPM funcionalizado com EHPV) e GelMA-NTCAPM-EHPV (ox) (GelMA contendo NTCAPM-EHPV obtido em meio oxidante). Meio de intumescimento: solução de tampão fosfato 0,01 mol/L pH 7,4. ***amostras com diferença significativa ($p < 0,001$) em relação a amostras de GelMA; # amostras com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras GelMA-NTCAPM e GelMA-NTCAPM (ox). ANOVA seguido de Tukey.....	82
Figura 8. Avaliação funcional pela escala BBB dos grupos laminectomia (LAM), tratados com veículo, hidrogel de gelatina metacrilada (GelMA), GelMA contendo extrato hidroetanólico de própolis vermelha (GelMA-EHPV), GelMA contendo nanotubo de carbono de parede múltipla GelMA-NTCAPM, GelMA-NTCAPM funcionalizado com EHPV (GelMA-NTCAPM-EHPV) avaliados antes da cirurgia, e nos tempos 24h, três e sete dias após a cirurgia. ANOVA seguida de Tukey, comparação feita entre as amostras em um mesmo tempo de análise (*) diferença dos grupos em relação ao grupo LAM para $p < 0,001$; (###) diferença dos grupos em relação ao grupo lesão para $p < 0,001$; ($\Delta\Delta\Delta$) diferença dos grupos em relação ao GelMA $p < 0,001$; (Δ) $p < 0,05$; ($\delta\delta\delta$) diferença dos grupos em relação ao GelMA-EHPV $p < 0,001$; (xxx) diferença do GelMA- MWNTCA-EHPV em relação ao GelMA-MWNTCA $p < 0,001$	83

LISTA DE QUADROS E TABELAS

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Parâmetros térmicos obtidos das curvas TGA/DTG. Legendas: NTCAPM (nanotubos de carbono de parede múltipla após tratamento com ácido), NTCAPM-BioA (NTCAPM funcionalizado com BioA), NTCAPM-Ft (NTCAPM funcionalizado com Ft), NTCAPS (nanotubos de carbono de parede simples após tratamento com ácido), NTCAPS-BioA (NTCAPS funcionalizado com BioA), NTCAPS-Ft (NTCAPS funcionalizado com Ft), BioA (biochanina A), Ft (formononetina)..... 58

Tabela 2. Eficiência de drogas ancoradas em NTCAPM após processo de funcionalização. 59

Tabela 3. Perfil térmico das amostras de nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCPM) antes e após funcionalização..... 77

CAPÍTULO 1

Quadro 1. Tipos de nanotubos de carbono, ilustração e breve descrição 33

CAPÍTULO 3

Quadro 1. Distribuição dos grupos experimentais. 70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

Anidrido metacrílico (AM)

Basso, Beattie, Bresnahan (BBB)

Enzima superóxido dismutase (SOD)

Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV)

Gangliosídeos (GM-1)

Gelatina metacrilada (GelMA)

Lesão da medula espinal (LME)

Matriz extracelular (MEC)

Medula espinal (ME)

Mesilato de tirilazad (MT)

Metilprednisolona (MP)

Naloxona (NL)

Nanotubos de carbono (NTC)

Nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCPM)

Nanotubos de carbono de parede múltipla após tratamento ácido (NTCAPM)

Nanotubos de carbono de parede simples (NTCPS)

Nanotubos de carbono de parede simples após tratamento ácido (NTCAPS)

Redução da atividade do malonaldeído (MDA)

Sistema nervoso (SN)

Sistema nervoso central (SNC)

Sistema nervoso periférico (SNP)

Trifosfato de adenosina (ATP)

Formononetina (Ft)

Biochanina A (Bio A)

Ultravioleta (UV)

RESUMO

Novos tratamentos têm sido propostos para restabelecer as condições sensório motoras de pacientes acometidos por lesão da medular espinal (LME). Este trabalho usou de nanoformulações contendo isoflavonas presentes no extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV) para o tratamento *in situ* da LME. Nesta perspectiva, o hidrogel de gelatina metacrilada (GelMA), fotopolimerizável *in situ*, pode atuar como estrutura 3D que favorece a proliferação celular, além de carrear o EHPV para o local da lesão. Além disso, os nanotubos de carbono (NTC) favorecem a condutividade elétrica e a reconexão axonal. Inicialmente foi realizado um estudo para definir o tipo de NTC (de paredes simples - NTCPS ou parede múltiplas - NTCPM) para o desenvolvimento das nanoformulações. Os NTC foram oxidados com tratamento ácido (solução com 15% de ácido nítrico e 15% de ácido sulfúrico) e funcionalizados por homogeneização utilizando formononetina (Ft) e biochanina a (BioA), sendo caracterizadas quanto à morfologia, dispersibilidade, ancoragem dos fármacos e estabilidade térmica, por meio de ensaios de dispersibilidade, microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada em espectrômetro de energia dispersiva (EDS), espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA) e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Observou-se que os NTCPM funcionalizados com isoflavonas apresentaram maior dispersibilidade e estabilidade térmica e também alterações estruturais em sua superfície e maior nível de oxidação, compatíveis com o ancoramento das isoflavonas, evidenciado por FTIR. Os NTCPM foram então selecionados para a etapa de teste com o extrato hidroetanólico de própolis vermelha. O material (NTCPM) foi submetido ao tratamento ácido (NTCAPM) e funcionalizado com o EHPV (NTCAPM-EHPV) em condições de ausência ou presença (NTCAPM-EHPV (ox)) de meio oxidativo, e então caracterizado por microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia (FTIR e Raman) e TGA. A dispersibilidade das amostras de NTCAPM-EHPV foi aumentada pelo processo de funcionalização com o extrato. Os espectros de Raman dos nanocompósitos revelaram a possível interação covalente entre as isoflavonas do EHPV e o NTCAPM. Estes resultados foram confirmados por TGA, com diminuição da temperatura de descarboxilação dos nanocompósitos. Os nanocompósitos foram então incorporados em hidrogéis de GelMA para a obtenção da formulação, que foi avaliada ainda quanto às condições de fotopolimerização e grau de intumescimento. A fotopolimerização de GelMA contendo NTCAPM foi possível a partir de 30 s. O índice de intumescimento do hidrogel contendo NTCAPM-EHPV foi reduzido em comparação com NTCAPM. Ratas Wistar adultas foram submetidas à laminectomia (LAM) ou hemiseção bilateral da medula espinal em nível torácico e submetidas ao tratamento com GelMA, GelMA-EHPV, GelMA-NTCAPM, GelMA-NTCAPM-EHPV, ou veículo, *in situ*, imediatamente após a lesão e foram avaliadas em relação à recuperação motora após 1; 3 e 7 dias por meio de escala de avaliação funcional de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB). No ensaio *in vivo* observou-se diminuição significativa na atividade locomotora em todos os grupos lesionados (veículo, GelMA-EHPV; GelMA-NTCAPM e GelMA-NTCAPM-EHPV) em relação ao grupo LAM, 24h após a cirurgia. Depois de 3 dias, o grupo lesão (CTR) manteve pontuação zero e os demais grupos lesionados e tratados com os hidrogéis apresentaram aumento significativo nos escores avaliados em relação ao grupo tratado com veículo. Além disso, o grupo tratado com GelMA-EHPV apresentou escores médios significativamente maiores que os dos demais grupos. Em 7 dias, os grupos tratados com nanoformulações contendo EHPV apresentaram os maiores escores (melhora funcional) em relação aos demais grupos lesionados. Portanto, foi possível concluir que os hidrogéis contendo nanocompósitos anti-inflamatórios fotopolimerizados *in situ* apresentaram efetividade no tratamento da LME em roedores.

Palavras chave: Própolis vermelha; antioxidante; anti-inflamatória.

ABSTRACT

New treatments have been proposed to restore the sensorimotor conditions of patients with spinal cord injury (SCI). This work proposes the use of nanoformulations containing isoflavones present in red propolis hydroethanolic extract (HERP) for the *in situ* treatment of LM. In this perspective, the methacrylated gelatin hydrogel (GelMA), photopolymerizable *in situ*, can act as a 3D structure that favors cellular search, in addition to carrying HERP to the lesion site. In addition, carbon nanotubes (CNT) favor electrical conductivity and axonal reconnection. Initially, a study was carried out to define the type of CNT (single-walled - SWCNT or multiple-walled - MWCNT) for the development of nanoformulations. CNT were oxidized with acid treatment (solution with 15% nitric acid and 15% sulfuric acid) and functionalized by homogenization using formononetin (Ft) and biochanin a (BioA), being characterized in terms of morphology, dispersibility, drug anchorage and thermal stability, through dispersibility tests, scanning electron microscopy (SEM) coupled to an energy dispersive spectrometer (EDS), fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA) and high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). It should be noted that the MWCNT functionalized with isoflavones showed greater dispersibility and therapeutic stability, as well as preserved alterations as its surface and a higher level of presentation, compatible with the anchoring of isoflavones, evidenced by FTIR. The MWCNT were then selected for the test step with the hydroethanolic extract of red propolis. The material (MWCNT) was subjected to acid treatment (MWCNTA) and functionalized with EHPV (MWCNTA -HERP) under conditions of absence or presence (MWCNTA-HERP (ox)) of an oxidative medium, and then characterized by transmission electron microscopy (MET), spectroscopy (FTIR and Raman), and TGA. The dispersibility of MWCNTA -HERP samples was increased by the functionalization process with the extract. The Raman spectra of the nanocomposites revealed the possible covalent interaction between HERP isoflavones and MWCNTA. These results were confirmed by TGA, with a decrease in the decarboxylation temperature of the nanocomposites. The nanocomposites were then incorporated into GelMA hydrogels to obtain the formulation, which was further evaluated in terms of photopolymerization conditions and degree of swelling. Photopolymerization of GelMA containing MWCNTA was possible from 30 s. The swelling index of the hydrogel containing MWCNTA-HERP was reduced compared to MWCNTA. Adult Wistar rats were observed after laminectomy (LAM) or bilateral hemisection of the spinal cord at the thoracic level and maintained on treatment with GelMA, GelMA-HERP, GelMA-MWCNTA, GelMA-MWCNTA-HERP, or vehicle, *in situ*, immediately after injury and were assessed regarding motor recovery after 1; 3 and 7 days using the Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) functional assessment scale. In the *in vivo* test, a significant decrease in locomotor activity was observed in all injured groups (vehicle, GelMA-HERP; GelMA-MWCNTA and GelMA-MWCNTA-HERP) compared to the LAM group, 24 hours after surgery. After 3 days, the injury group (CTR) maintained the zero rating and the other injured and hydrogel-treated groups showed a significant increase in the scores considered in relation to the vehicle-treated group. In addition, the GelMA-HERP-treated group had significantly higher mean scores than the other groups. In 7 days, the groups treated with nanoformulations containing HERP showed the highest scores (functional improvement) in relation to the other injured groups. Therefore, it was possible to conclude that hydrogels containing *in situ* photopolymerized anti-inflammatory nanocomposites demonstrated in the treatment of SCI in rodents.

Keywords: Red propolis; antioxidant; anti-inflammatory.

1 INTRODUÇÃO

A lesão da medula espinal (LME) promove alterações fisiopatológicas consideradas irreversíveis para regeneração do Sistema Nervoso Central (SNC) (FAN *et al.*, 2018). As alterações promovem perda de neurônios e células da glia e consequente formação de pseudocistos, onde a comunicação axonal é interrompida. Como consequência, observam-se disfunções sensório-motoras que incapacitam cerca de 500 mil pessoas por ano no mundo (WHO, 2016). A LME ocasiona um desequilíbrio do microambiente medular que consiste em três níveis (tecidual, celular e molecular). O nível tecidual envolve hemorragia, isquemia e formação de cicatriz glial. O nível celular envolve ativação de astrócitos, diferenciação de células-tronco neurais, infiltração de macrófagos. O nível molecular envolve expressão de fatores neurotróficos, quimiocinas e citocinas. Todos os níveis dificultam a regeneração da área de lesão (FAN *et al.*, 2018; VENKATESH *et al.*, 2019).

Diferentes tipos de tratamentos são realizados em pacientes com LME, tais como, cirurgias reparadoras e reabilitação fisioterapêutica que atuam a nível tecidual, além de reparar estruturas e déficits pós trauma. Administração de fármacos anti-inflamatórios por via oral, que atua sobre os níveis celular e molecular. Tais tratamentos visam minimizar os danos provenientes do trauma, bem como, para promover melhora na qualidade de vida do indivíduo. No entanto, ainda não existe cura para o problema (ROUANET *et al.*, 2017).

A utilização de fármacos anti-inflamatórios por via oral, a exemplo dos esteroides, é controversa. Estudos mostraram que não houve resultados relevantes com a utilização dos esteroides, além de apresentar efeitos colaterais graves como infecção, hemorragia gastrointestinal, embolia pulmonar e sepse (KARSY *et al.*, 2019; ELI *et al.*, 2021). Entretanto, entre as diversas propostas de tratamento medicamentoso para LME, a utilização de extratos naturais demonstrou-se promissor. Tais extratos apresentam na sua constituição química compostos fenólicos, a exemplo da formononetina, daidzeína e biochanina-A, que possuem atividade anti-inflamatória e antioxidante experimentalmente descritos em diversos estudos (CAVENDISH *et al.*, 2015 e NOVAIS *et al.*, 2021). Dessa forma, o extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV) tem sido amplamente estudado como anti-inflamatório. Além disso, as moléculas presentes neste extrato podem atuar no estresse oxidativo que ocorre após lesão e assim minimizar os eventos secundários da LME (NOVAIS *et al.*, 2021).

Um outro fator de extrema importância para o sucesso do tratamento da LME é reversão da incapacidade da regeneração axonal. Esta incapacidade ocorre devido a formação da cicatriz glial. Como estratégia para evitar a formação da cicatriz glial, a administração *in situ* de moléculas anti-inflamatórias em sistemas de liberação de fármacos é uma alternativa. Polímeros fotopolimerizáveis como a gelatina metacrilada (GelMA) são

capazes de carrear as moléculas e mantê-las no local da lesão (FAN *et al.*, 2018; NOVAIS *et al.*, 2021).

O polímero fotopolimerizável GelMA tem apresentado propriedades promissoras, demonstrando biocompatibilidade e baixa toxicidade. É um excelente substrato para adesão e proliferação celular, além de apresentar características biodegradáveis e possibilitar a veiculação e liberação de fármacos pela administração *in situ* (NICHOL *et al.*, 2010; KWON *et al.*, 2018). A administração do hidrogel fotopolimerizável *in situ* favorece o preenchimento dos pseudocistos, além de manter as substâncias anti-inflamatórias no local da lesão, e consequentemente inibir a formação da cicatriz glial (FAN *et al.*, 2018).

NA LME, o impulso nervoso é interrompido após morte axonal. Estudos demonstram que nanotubos de carbono (NTC) destacam-se por apresentarem morfologia cilíndrica semelhantes à dos dendritos neuronais e condutividade elétrica que favorece a condução do impulso nervoso (FABBRO *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2018; KURBANOGU; OZKAN, 2018). Entretanto, os NTC apresentam uma alta toxicidade. Diversos estudos têm demonstrado que a toxicidade dos NTC pode ser inibida após a funcionalização das moléculas, aumentando sua dispersibilidade. Tais tratamentos aumentam sua dispersibilidade, impedindo sua aglomeração nos tecidos e tornando-os biocompatíveis. Vasconcelos *et al.* (2020) demonstraram a possibilidade de funcionalização de NTC utilizando substâncias farmacologicamente ativas.

Neste contexto, este trabalho propõe o desenvolvimento de formulações de gelatina metacrilada contendo NTC funcionalizados com isoflavonas presentes no EHPV para aplicação *in situ* no tratamento da lesão medular experimentalmente induzida em modelo murino.

O presente trabalho será dividido em 3 capítulos, nos quais o primeiro capítulo traz uma revisão de literatura abordando a LME, além de estudos sobre a utilização do hidrogel de GelMA, do EHPV e dos NTC como opção de tratamento. O segundo capítulo é apresentado como um artigo que versa sobre a caracterização dos diferentes tipos de NTC funcionalizados com isoflavonas presentes no EHPV. O terceiro capítulo envolve a avaliação das hidrogéis de GelMA contendo nanotubos de carbono de parede múltipla e EHPV sobre o processo inflamatório e recuperação funcional dos animais submetidos a LME.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver nanoformulações fotopolimerizáveis a base de gelatina metacrilada contendo nanotubos de carbono funcionalizados com isoflavonas (Formononetina, Biochanina-A e EHPV) para o tratamento *in situ* da lesão medular em modelo murino.

2.2 Objetivos específicos

Analisar o processo de funcionalização dos nanotubos de carbono (NTCPM e NTCPS) utilizando isoflavonas (Formononetina e Biochanina-A) presentes no extrato hidroetanólico de própolis vermelha;

Desenvolver formulações fotopolimerizáveis à base de gelatina metacrilada (GelMA) contendo nanotubos funcionalizados com EHPV;

Analisar o efeito das formulações desenvolvidas de forma indireta sobre o processo inflamatório e recuperação funcional de animais submetidos a LME.

CAPÍTULO 1

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Lesão da medula espinal (LME)

O Sistema Nervoso (SN) subdivide-se em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é constituído pelo encéfalo e pela medula espinal (ME) e é responsável pela condução nervosa entre o corpo e o encéfalo (MOORE *et al.*, 2006).

A ME recebe os comandos do córtex motor e é responsável por controlar os movimentos do tronco e extremidades superior e inferior, sendo está situada dentro do canal vertebral. A ME é formada por sulcos e fissuras e ambas as estruturas se unem e formam as raízes ventrais e dorsais dos nervos espinais. A ME é também constituída pela substância branca e cinza, a primeira contém fibras e axônios mielinizados, que leva informações do SNC através das vias eferentes para o SNP e traz informações do SNP por vias aferentes para o SNC A (SILVA *et al.*, 2013). segunda localiza-se no interior da substância branca e subdivide-se em cornos (anterior, lateral e posterior) constituída por corpos celulares de interneurônios, neurônios eferentes, neurônios aferentes e células gliais (BICAN *et al.*, 2013).

A perda da comunicação entre o SNC e SNP pode ocorrer por meio de lesões não traumáticas como doenças congênitas e compressão de tumor ou lesões traumáticas que podem ser causadas por acidentes automobilísticos, lesão por arma de fogo, esportes radicais, mergulho em superfície rasa, entre outros (AHUJA *et al.*, 2017). A gravidade da LME vai depender do nível da lesão e da sua extensão no local do trauma, que pode ocasionar uma lesão parcial e incompleta ou total e completa (HAISMA *et al.*, 2007).

A LME afeta principalmente homens com idade entre 17 e 35 anos de idade (HORASANIZADEH *et al.*, 2019). Os estudos mostram que ocorrem de 30 a 40 casos de LME a cada 1 milhão de habitantes por ano (ROUANET *et al.*, 2017). O trauma promove danos aos diversos sistemas: respiratório, urinário, músculo-esquelético entre outros. No entanto, o sistema de maior acometimento é o neurológico, que após o trauma sofre perda sensório-motora do nível da lesão para baixo, ocasionada pela morte dos axônios locais e pelo processo inflamatório exacerbado, influenciando diretamente na qualidade de vida (AHUJA *et al.*, 2017).

O dano à ME ocorre comumente por lesões traumáticas, que resulta em uma sequência de eventos conforme ilustrado na (Figura 1) (KATOH *et al.*, 2019). O estágio inicial, ou seja, o trauma propriamente dito é chamado de lesão primária, caracterizada pelos fragmentos ósseos, rompimento de ligamentos, interrupção da comunicação nervosa entre o

SNC e SNP, levando a destruição do parênquima neural, ruptura da rede axonal, hemorragia e ruptura da membrana glial (GENSEL; OOR, 2017).

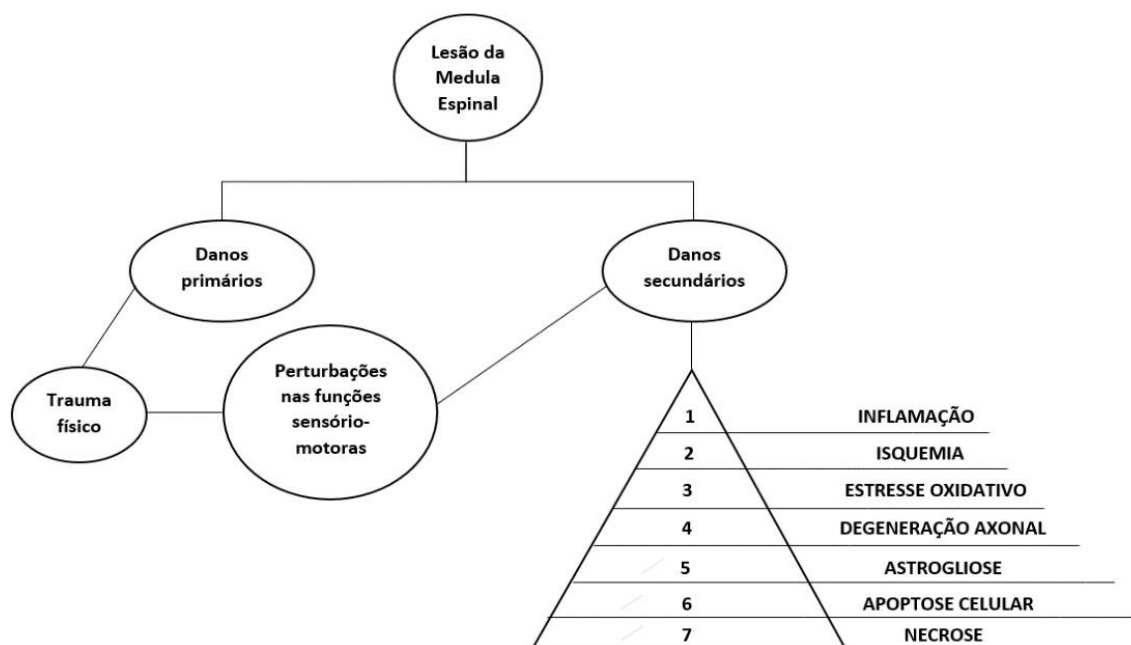


Figura 1. Danos primários e secundários da LME.

A sequência de eventos posteriores ao trauma inicial denomina-se lesão secundária, responsável pela ativação de uma série de mecanismos na área lesada e perilesão, envolvendo fatores moleculares (citocinas), celulares (células inflamatórias) e vasculares. Este desequilíbrio contribui para a progressão do dano (DIMITRIJEVIC *et al.*, 2017).

A lesão secundária é dividida em quatro fases: i. aguda: ocorre até 48 horas após o trauma; ii. subaguda: ocorre de 48 horas a 14 dias após o trauma; iii. intermediária: ocorre de 15 dias a 6 meses após o trauma; iv. crônica: ocorre após 6 meses do trauma. A fase aguda possui extrema relevância, pois os eventos desencadeados nesta fase determinam a gravidade da lesão, que depende diretamente da extensão do dano inicial e do tempo da compressão a ME (COUILLARD *et al.*, 2017; SÁMANO; NISTRI, 2017).

O impacto causado à medula promove o rompimento da barreira hemato-medular (análoga à barreira hematoencefálica) e dos vasos sanguíneos, causando hemorragia, liberação de eletrólitos, metabólitos e enzimas e morte neural imediata pelo rompimento das membranas celulares (BOTERO; GÓMEZ; CHAPARRO, 2013). As células sanguíneas e proteínas do soro invadem a área de lesão, causando edema e aumento da pressão intersticial, que gera isquemia, hipóxia/anoxia e hipoglicemia.

O edema pode se manter por até 15 dias após a LME sendo inicialmente maior na substância cinzenta quando comparado à substância branca, além de ser responsável por

causar alterações na microvasculatura local que leva a desmielinização e degeneração neural (BOTERO; GÓMEZ; CHAPARRO, 2013).

Outro fator extremamente importante após a LME é a inflamação, que ocorre a partir do rompimento da barreira hemato-medular e dos vasos sanguíneos. Essa inflamação ocorre como uma resposta fisiológica do organismo que ativa o sistema imune, porém sua extensão torna-se um fator determinante no tipo de sequela pós lesão, além de causar morte necrótica ou isquêmica (DEL BEL; SILVA; MLADINIC, 2009; AHUJA *et al.*, 2017). Essa inflamação é caracterizada pela presença de fagócitos como os macrófagos, neutrófilos que exercem função macrofágica e pelas micróglias, que são ativadas durante o processo inflamatório, que juntamente com as células fagocitárias liberam citocinas responsáveis pela ativação astrocitária, interleucinas (IL)-1a, IL-1b, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)- α . (DEL BEL; SILVA; MLADINIC, 2009; DIMITRIJEVIC *et al.*, 2017).

Concomitantemente outros eventos ocorrem como a ativação excessiva dos receptores excitatórios de glutamato e aspartato que em excesso causam excitotoxicidade, apoptose de células gliais e neurônios (COUILLARD *et al.*, 2017). O glutamato é um neurotransmissor excitatório liberado no SNC logo após a lesão e atinge níveis tóxicos rapidamente. Os níveis elevados de glutamato, alteram o fluxo iônico aumentando as concentrações intracelulares de Na^+ e Ca^{2+} e diminuindo as concentrações intracelulares de K^+ . Esse acúmulo de Ca^{2+} prejudica a respiração mitocondrial, promove depleção de energia e consequentemente o desequilíbrio iônico (JHA *et al.*, 2019). O comprometimento na função Na^+/K^+ ATPase eleva a despolarização da membrana axonal, leva ao influxo excessivo de Na^+ dentro das membranas dos axônios, edema citotóxico celular, aumento de Ca^{2+} e permeabilidade da membrana, ativação de fosfolipase, estresse oxidativo pelo aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e disfunção mitocondrial (ANJUM *et al.*, 2020).

O estresse oxidativo ocorre devido a um desequilíbrio entre a geração dos compostos oxidantes e o sistema antioxidante de defesa do organismo que leva a alterações fisiológicas, sendo as doenças uma das principais causas desse desequilíbrio (LEE *et al.*, 2015). Fisiologicamente o estresse oxidativo ocorre diariamente na produção de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP), para o funcionamento do organismo que ocorre a partir do processo de fosforilação oxidativa, que em meio aos produtos, formam radicais livres e EROs. As EROs são produzidas nas organelas e compartimentos da mitocôndria, onde ocorre a produção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A geração mitocondrial de ânions do superóxido dismutase, através dos complexos II e III contribuem para que hidrogênio e oxigênio sejam elevados ao quadrado por ação do superóxido, ou seja, sofram oxidação. Dessa forma, quando este peróxido se encontra na presença do íon de ferro III (Fe^{3+}), sofre uma reação química do tipo fenton que faz com que radicais livres de hidroxila sejam formados. Esses

radicais, por sua vez, são muito reativos e removem rapidamente átomos de hidrogênios das macromoléculas que compartilham do mesmo ambiente (HAUCK & BERNLOHR, 2016).

Sendo assim, as proteínas, fosfolipídios e triglicerídeos presentes nessas biomacromoléculas, são os primeiros alvos de ataques dos radicais livres, o que resulta primeiramente em uma oxidação das proteínas e posteriormente uma formação de radicais lipídicos, que por sua vez tem uma grande facilidade em se oxidar, levando a peroxidação lipídica em cadeias acilas, em que os fosfolipídios supracitados sofreram um rearranjo em suas ligações químicas, permitindo a captura de radicais livres. As cadeias acilas depois da peroxidação passam então a sofrer clivagens não enzimáticas de Hock em que as famílias de aldeídos não serão quebradas, o que por consequência irão formar enormes cadeias carbônicas dependente do nível de insaturação e de qual espécie lipídica foi oxidada (HAUCK & BERNLOHR, 2016; SALIM, 2017; WOZNIAK *et al.*, 2016).

O desequilíbrio na produção e no metabolismo das EROs dá início a um ambiente extremamente oxidado. Fisiologicamente o estresse oxidativo é neutralizado pelo sistema antioxidante do organismo, formado pelas enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Quando as espécies antioxidantes reguladoras desses níveis falham na neutralização, ocorre a oxidação das proteínas e a peroxidação lipídica, levando os radicais livres a tornarem-se nocivos promovendo dano oxidativo e degeneração tecidual (SALIM, 2017).

Todos os desequilíbrios pós-traumáticos, promovem a degeneração axonal, que induz a degeneração Walleriana, promovendo ainda mais degeneração axonal. A degeneração Walleriana, forma bulbos de retração que inibe a regeneração axonal, causando a morte axonal (COUILLARD *et al.*, 2017).

O acometimento dos axônios e oligodendrócitos que são células mielinizantes que promovem a proliferação e mielinização dos axônios leva a necrose e apoptose que promove a perda da função axonal (ANJUM *et al.*, 2020). Juntamente com a degeneração axonal e todo processo inflamatório que ocorre na área de injúria, um mecanismo reativo é iniciado pelo astrócitos (astroglíose) um processo fisiológico do organismo com intuito de reparar a lesão (FAN *et al.*, 2016). Os astrócitos reativos quando chegam na área de lesão expressam moléculas de adesão celular como a N-caderina e formam a cicatriz glial (glíose) que ocorre após a formação da cavidade cística na área de lesão, atuando diretamente na modulação da reação imunológica e inflamatória no local (DEL BEL; SILVA; MLADINIC, 2009), e essa cicatriz torna-se o maior obstáculo para reconexão axonal (GÓMEZ; CHAPARRO, 2013).

Diante da LME, alguns tratamentos são iniciados imediatamente após o trauma, com intuito de minimizar as sequelas subsequentes à lesão. No entanto, novas propostas capazes de atenuar os danos secundários à lesão foram desenvolvidas e atualmente tornaram-se alvo de estudo.

1.2 Tratamento imediato após LME

Após o trauma ao chegar no hospital os pacientes recebem um ou mais dos tratamentos denominados de precoces, estes englobam procedimento cirúrgico para descompressão e administração de fármacos (HACHEM *et al.*, 2017; ROUANET *et al.*, 2017).

A cirurgia de descompressão é um procedimento importante nos pacientes com LME, uma vez que estes sofrem acometimentos ligamentares, musculares, nervosos e ósseos. Esse procedimento visa diminuir a pressão existente no local e por consequência reduzir os efeitos secundários, sendo favorável para recuperação (ROUANET *et al.*, 2017). É necessário que a cirurgia de descompressão seja realizada de forma precoce, quanto mais rápido, melhor será o prognóstico do paciente, uma vez que sendo iniciado o reparo cirúrgico dentro de 24h, menor é o comprometimento neurológico e motor. Como descrito no estudo de Fehlings *et al.* (2012), a indicação cirúrgica precoce em pacientes com LME mostrou efeitos positivos, resultando em melhora na motricidade desses pacientes. Assim, foi preconizado na diretriz proposta por Fehlings *et al.* (2017), que a cirurgia de descompressão deve ser realizada entre 12-24 horas após o trauma. No entanto, o procedimento cirúrgico irá atuar sobre a descompressão das estruturas e no reparo dos ligamentos, músculos e estruturas ósseas. Já para atenuar o processo inflamatório a administração de fármacos é indicada (HACHEM *et al.*, 2017).

A administração de fármacos é extremamente importante para recuperação dos pacientes, estes são administrados na fase aguda da injúria. Entre os medicamentos estão: metilprednisolona (MP), mesilato de tirilazad (MT), GM-1 gangliosídeos e naloxona (NL) (ROUANET *et al.*, 2017).

A inflamação é um dos danos secundários mais agravantes para o acometimento por LME, desse modo um dos tratamentos mais utilizados para redução da inflamação, é a administração de fármacos anti-inflamatórios, sendo a MP por via intravenosa (i.v.), o mais utilizado e com melhor resultado entre os medicamentos sintéticos. A MP pertence à classe dos anti-inflamatórios esteroides, que atuam reduzindo o processo inflamatório, resultando na redução de danos secundários subsequentes à inflamação (ROUANET *et al.*, 2017). As aplicações desses esteroides aumentam a liberação sistêmica de citocinas com potencial anti-inflamatório e viabilização das células neurais, através do bloqueio da ciclo-oxigenase II (COXII) (HACHEM *et al.*, 2017). No entanto, o uso excessivo ou prolongado da MP pode trazer consequências estomacais, e reação adversa a medicamentos (RAM) comum aos anti-inflamatórios. Essa RAM pode levar ao sangramento na mucosa estomacal devido a diminuição da produção de prostaglandinas pelas proteínas liberadas pelo ácido araquidônico (EVANIEW *et al.*, 2016).

O MT é um medicamento que atua na peroxidação lipídica, e que na década de 90, foi alvo de alguns estudos sobre o seu potencial no tratamento da LME em comparação com a MP (ROUANET *et al.*, 2017). Smith *et al.* (1996), descreve que o metabólito U-89678 do MT apresentou efeitos neuroprotetor em estudos clínicos de fase III, atribuindo essa justificativa a redução dos efeitos apoptóticos. No entanto, nos estudos clínicos de Bracken *et al.* (1997), foi comparado o uso da MP e do MT durante 48 horas, concluindo que não é possível justificar o uso do MT para tratar a LME, pois não houve diferença significativa entre os grupos do estudo em questão.

Os GM-1 fazem parte do conjunto de glicolipídios presentes em células neurais (ROUANET *et al.*, 2017). Estudos clínicos de Barros *et al.* (2016) descreveram que a terapia com GM-1 demonstrou melhoras na função motora de pacientes com lesões cervicais ou torácicas, independente do sexo. Marcon *et al.* (2016) realizaram estudos do GM-1 em modelo animal de LME, constatando efeitos regenerativos e recuperação motora, porém é descrito que o efeito neuroprotetor está relacionado à combinação com a eritropoetina que atua reduzindo a isquemia e tem seu efeito potencializado pelo GM-1, o que resulta na neuroproteção.

A dor neuropática está presente em mais da metade dos casos de acometimento por LME, interferindo diretamente na qualidade de vida dos indivíduos (SHIAO *et al.*, 2018). Diante disso, é utilizado o fármaco NL, um antagonista de receptores opióides por via intraperitoneal, essa via apresenta eficácia por aumentar a perfusão da ME (ACHER *et al.*, 2016). No entanto, a questão neuroprotetora ainda é contraditória no meio científico. Já está consolidado que a NL quando bloqueia os receptores dos opióides endógenos (moduladores da dor), neutraliza os efeitos neurotóxicos e normaliza o fluxo sanguíneo (RAMOS *et al.*, 2015). No que diz respeito a recuperação motora quando comparado com MP não obteve resultados positivos em curto prazo (ROUANET *et al.*, 2017), todavia a função motora em terapia com NL se dá em associação a exercícios que aumentam a produção de fatores neurais e estimulação de células da glia (SUMIZONO *et al.*, 2018).

A administração de fármacos é um recurso eficaz no tratamento da LME, mas por apresentarem efeitos colaterais graves, sua administração é limitada. Dessa forma, novas terapias são estudadas ao longo dos anos, a fim de novos tratamentos que sejam promissoras para o tratamento de injúrias no SNC.

1.3 Novas abordagens para o tratamento da LME

Com a necessidade de novas alternativas para o tratamento da LME, estudos são realizados com ênfase na recuperação motora (neuorreabilitação), na proteção de células e

redução do processo inflamatório (neuroproteção) e na inibição da formação da cicatriz glial (neuroregeneração).

A neuroreabilitação consiste em técnicas e exercícios utilizados por profissionais fisioterapêuticos com o objetivo de promover a reabilitação motora e melhorar a qualidade de vida. A recuperação do indivíduo se dá por métodos fisioterapêuticos não invasivos, que objetivam fortalecer a musculatura, melhorar a amplitude de movimento e inibir progressão da perda sensório-motora. Todos esses objetivos não só contribuem para a recuperação da lesão medular em si, mas também na qualidade de vida do indivíduo (SANDROW-FEINBERG & HOULÉ, 2015; HACHEM *et al.*, 2017). A recuperação pós-tratamento fisioterapêutico está diretamente relacionada a melhora no córtex cerebral, da função medular, na estrutura neural, fortalecimento da estrutura musculoesquelética e com alterações bioquímicas e eletrofisiológicas (FU *et al.*, 2016).

A neuroproteção objetiva a proteção de células neurais que não sofreram ação do trauma inicial causador da LME e prevenção dessas células, a exemplo os neurônios. No entanto, tais células não estão isentas dos danos provenientes dos eventos secundários da LME (SANDROW-FEINBERG & HOULÉ, 2015). Os danos secundários na LME ocorrem em uma sequência de eventos que podem ocorrer simultaneamente (inflamação, isquemia, estresse oxidativo, degeneração axonal, astrogliose, apoptose celular e necrose) (SHENDE & SUBEDI, 2017; HE *et al.*, 2019). Por isso, ao longo dos anos foram desenvolvidos tratamentos que visam o efeito neuroprotetor. O potencial neuroprotetor de uma terapia está relacionado com sua capacidade anti-inflamatória e antioxidante, que seja capaz de reduzir os eventos secundários pós lesão (ROUANET *et al.*, 2017).

Entre os tratamentos neuroprotetores não farmacológicos, tem-se a hipotermia, que reduz danos secundários como inflamação, isquemia e morte celular, contribuindo para a recuperação neuronal (ROUANET *et al.*, 2017). A hipotermia tem eficácia na melhora da função motora, pois atua bloqueando as vias de síntese de proteínas que inibe a regeneração axonal na LME (Xu *et al.*, 2016). Os efeitos neuroprotetores da terapia hipotérmica podem ser ampliados quando combinados com tratamentos farmacológicos e terapias baseadas na utilização de células tronco (SUN *et al.*, 2019).

No que diz respeito à neuroproteção utilizando fármacos, tem-se clinicamente testado o riluzol e a minociclina. O riluzol é um medicamento desenvolvido para o tratamento da Esclerose Lateral Amiotrófica e atua como inibidor do neurotransmissor glutamato responsável pela ativação dos canais de sódio. Seu uso na LME está relacionado ao acúmulo deste íon, que se apresenta como efeito nocivo aos neurônios, pois favorece o desequilíbrio iônico, bloqueando as sinapses (CHOW *et al.*, 2012; NAGOSHI *et al.*, 2015; GAZDIC *et al.*, 2018). Os ensaios clínicos demonstram que pacientes tratados com riluzol apresentaram melhora na função sensório-motora, pois quando há o bloqueio de receptores de glutamato,

consegue-se proteger o neurônio (NAGOSHI *et al.*, 2015; MESHKINI *et al.*, 2018). Já a minociclina é um antibiótico, com potencial anti-inflamatório e antioxidante que apresentou redução no edema e proteção dos neurônios, em estudos clínicos, o que justifica a premissa que para se obter um efeito neuroprotetor eficaz, precisa-se tratar os efeitos secundários antecessores a apoptose celular (ROUANET *et al.*, 2017).

No entanto, terapias farmacológicas apresentam RAM que podem ser prejudiciais. As RAM envolvidas na farmacodinâmica ou farmacocinética do riluzol são: pneumonia intersticial, sintomas no trato gastrointestinal, tonturas, sonolência e incontinência urinária (INOUE-SHIBUI *et al.*, 2019). Já as RAM ligadas à minociclina a indução da hiperpigmentação induzida pela oxidação da pele (JUDSON *et al.*, 2017), além do já consolidado para antibiótico, relacionado a possibilidade de resistência bacteriana devido ao uso prolongado ou excessivo. Todas essas RAM levam ao agravamento do quadro dos pacientes acometidos pela LME, por isso estudos com produtos naturais vêm sendo utilizados por apresentarem condições favoráveis e baixa ou nenhuma toxicidade.

Além disso, todas as terapias até aqui descritas são de uso oral, o que gera a necessidade de uma dose que leva a efeitos sistêmicos, podendo ser deletério a tecidos saudáveis. Estratégias para o tratamento *in situ* da LME ainda são pouco descritas na literatura (WANG *et al.*, 2017; FAN *et al.*, 2018; VASCONCELOS *et al.*, 2020; NOVAIS *et al.*, 2021) e podem reduzir os efeitos adversos causados pelas substâncias anti-inflamatórias e antioxidantes.

A neuroregeneração tem o intuito de regenerar os tecidos que sofreram danos após a LME. Nesta etapa, pretende-se promover a reconexão axonal e a modulação do processo inflamatório, evitando a formação da cicatriz glial que impede a reconexão (SANDROW-FEINBERG & HOULÉ, 2015). Dessa forma, dentre as terapias que são utilizadas para promover a regeneração do tecido neural destacam-se as terapias com a utilização de células-troncos embrionárias, neurais, pluripotentes induzidas e progenitoras endimárias, que minimizam os eventos secundários resultando assim na regeneração. Atuam no crescimento e diferenciação celular, remielinização e na recuperação motora. No entanto, mesmo com sua eficácia provada, podem apresentar grande desvantagem imunológica. Algumas linhagens, a exemplo de células-tronco progenitoras endimárias podem se renovar, com isso podem se diferenciar em células neurais, como neurônios e células da glia. A vantagem em relação às outras linhagens, é a baixa capacidade de se diferenciar em tumores (MANLEY *et al.*, 2017; GAZDIC *et al.*, 2018; NAGOSHI *et al.*, 2018).

Outra abordagem dentro da neuroregeneração é o uso de biomateriais, implantados no local da lesão. A maioria dos biomateriais atuam como andaimes, estruturando e organizando o local para favorecer o crescimento celular e facilitar o reparo tecidual (QI *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2018). Também podem atuar com sistemas de liberação de fármacos *in*

situ. A implantação do biomaterial no local da lesão pode diminuir os problemas relacionados à liberação sistêmica dos medicamentos, evitando altas doses e efeitos adversos, além de preencher as cavitações geradas pós-trauma, se tornando ambiente favorável para o crescimento celular (FAN *et al.*, 2018). A nanotecnologia também é aliada na reconstrução neuronal. Os nanomateriais têm sido explorados como alternativa de tratamento de diversas doenças. A utilização dessa tecnologia na área médica tem sido muito benéfica, pois trouxe resoluções para problemas de biodisponibilidade de fármacos, melhorando a performance de sistemas de liberação de substâncias ativas no organismo (BHUSHAN *et al.*, 2017).

1.3.1 Produtos naturais como agentes neuroprotetores

Dentre as substâncias que atuam em inflamações agudas, reduzindo o estresse oxidativo, destacam-se os produtos naturais. O uso de produtos naturais para o tratamento da LME está relacionado diretamente com os danos secundários já descritos. Desse modo, dentre as moléculas de origem natural que apresentam efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e neuroprotetores destacam-se os polifenóis. Estas moléculas são caracterizadas por conter em sua estrutura uma hidroxila fenólica, e têm a função de dar cor e proteger os vegetais (Figura 2). Podem ser encontrados em extratos de produtos naturais de origem vegetal ou animal (HUSSAIN *et al.*, 2016; MALIK *et al.*, 2018).

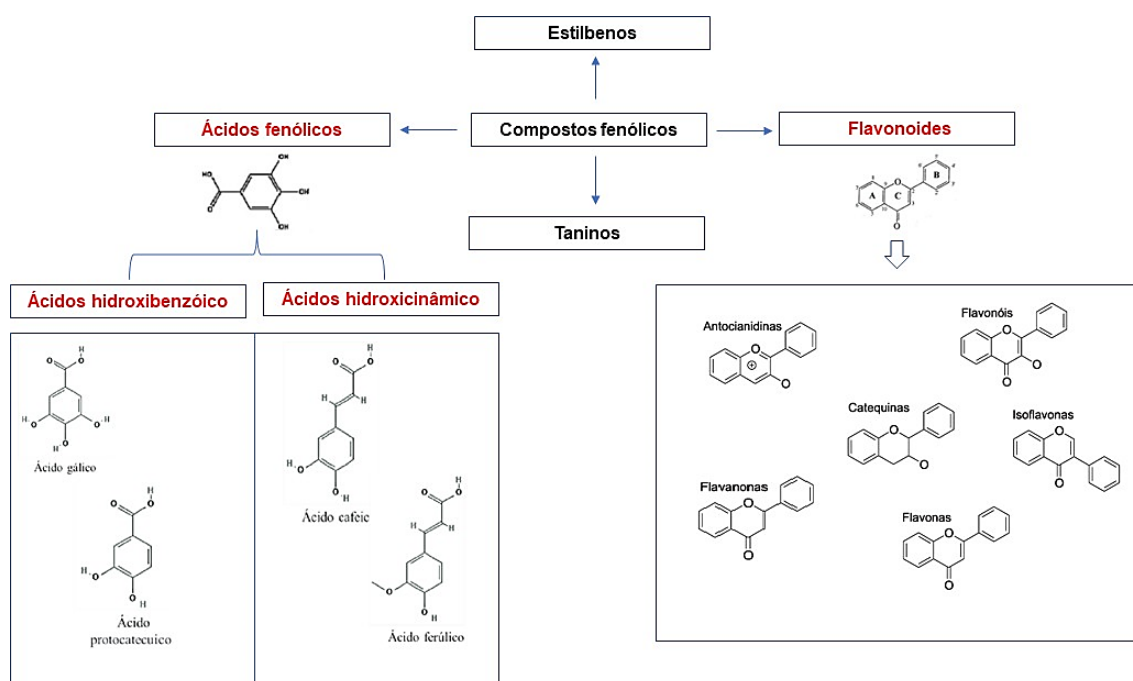


Figura 2. Compostos fenólicos como agentes neuroprotetores.

Vários estudos têm descrito o uso de produtos naturais como estratégia para o tratamento da LME. A delphinidina, exemplo de antocianina, é encontrada nas sementes de uva, e foi testada em modelo animal de LME, administrada oralmente. O efeito anti-inflamatório apresentado pela molécula tem mecanismo de ação semelhante ao de anti-inflamatórios já conhecidos, ou seja, inibindo a enzima ciclo-oxigenase II (COX II) responsável pela produção de prostaglandinas, principal sinalizador de inflamações e revestimento estomacal (WANG *et al.*, 2017).

Já o efeito antioxidante neuroprotetor tem sido relatado no uso da icariína, um metabólito secundário produzido pela espécie *Barberry epimedium*, encontrada em países asiáticos. O potencial antioxidante foi observado pelo aumento da enzima superóxido dismutase (SOD), redução da atividade do malonaldeído (MDA) e redução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e lipídicas, conseguindo assim promover a recuperação da função motora e possuir efeitos neuroprotetivos. No entanto, a substância apresentou efeitos pró-inflamatórios (LI *et al.*, 2018; REN *et al.*, 2018).

O efeito neuroprotetivo também foi estudado utilizando *Scutellaria baicalensis*, do gênero Laminacea. Seu extrato etanólico, que contém flavonoides, apresentou atividade neuroprotetora, atividade anti-inflamatória e antioxidante, e efeito anti-apoptose. Também foi capaz de melhorar morfológicamente o tecido lesionado, devido a redução do edema; promoveu recuperação motora, proteção aos neurônios, o que em conjunto pode promover a regeneração axonal, com resultados semelhantes ao grupo tratado com MP (ZHANG *et al.*, 2018).

Um produto natural de grande destaque é a própolis, que é uma resina produzida por abelhas a partir da flora circundante. O principal objetivo desta resina é proteger a colmeia de micro-organismos. Além disso, diversos estudos apontam seu potencial anti-inflamatório e antioxidante.

1.3.1.1 Própolis

A própolis é composta por diversos biomarcadores como polifenóis, terpenóides, aminoácidos e açúcares devido sua composição diversificada. A própolis brasileira é classificada em função da sua cor em 13 variedades diferentes. No estudo de neuroproteção destacam-se principalmente três tipos de própolis - a verde, marrom e a vermelha (KOCOT *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018).

A própolis verde, encontrada no sudeste do Brasil, demonstrou inibir o estresse oxidativo em danos neurais, além de inibir a neurodegeneração, atuando assim na neuroproteção (NI *et al.*, 2017). Esse efeito antioxidante é atribuído aos flavonoides (flavonóis) encontrados nesse tipo de própolis (UEDA *et al.*, 2017). Os flavonoides (quercetina e

naringenina) e os ácidos fenólicos presentes na própolis marrom, apresentaram atividades neuroprotetivas, antioxidantes e potencial anti-isquêmico, em danos neurais e degenerativos, em modelo animal (BAZMANDEGAN *et al.*, 2017).

A literatura descreve que qualquer tipo de própolis, independente da região geográfica onde é produzida e da quantidade de biomarcadores, possui potencial antioxidante significativo. No entanto, esse potencial tem sido ainda superior quando se utiliza própolis vermelha adquirida no Brasil (REIS *et al.*, 2019). Dantas Silva *et al.* (2017) analisaram o potencial antioxidante das própolis verde, marrom e vermelha. O estudo demonstrou maior atividade antioxidante para as amostras de própolis vermelha.

1.3.1.2 Própolis vermelha (PV)

É o 13º tipo encontrado no Brasil e apresenta uma alta quantidade de flavonoides e terpenos, que são responsáveis pela sua atividade antioxidante diferenciada (DEVEQUINUNES *et al.*, 2018). A PV pode ser utilizada para a produção de extratos etanólicos ricos em flavonoides. Tais extratos apresentaram atividade regenerativa em lesões do sistema nervoso, auxiliando assim na regeneração axonal (BARBOSA *et al.*, 2016). Além das atividades neuroprotetoras já descritas, a PV apresenta atividade antimicrobiana, antitumoral, antiparasitária e antinociceptiva (REIS *et al.*, 2019).

No estudo de Pilocotto *et al.* (2019) foi possível verificar resultados que comprovam a atividade anti-inflamatória do EHPV para tratamento de lesões e feridas quando aplicada topicamente. Melo *et al.* (2018) demonstraram que PV administrada por via oral, tem efeitos imunomoduladores de células inflamatórias. Já Cavendish *et al.* (2015) descreveram em seu estudo o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo da PV em animais, atribuindo a sua ação à formononetina, principal marcador químico do EHPV. Para Batista *et al.* (2018), o EHPV demonstrou efeito fotoprotetor em modelo animal atuando como produto antioxidante topicamente.

A neuroproteção produzida pela própolis vermelha foi descrita por Barbosa *et al.* (2015), em que o extrato hidroetanólico demonstrou efeito neuroprotetor no tratamento de lesão no nervo ciático promovendo recuperação sensório-motora. Novais *et al.* (2021) utilizaram gelatina metacrilada GelMA e extrato hidroetanólico de própolis vermelha EHPV para tratar LME. Foi evidenciado a ação neuroprotetora do extrato, demonstrando melhora nas funções sensório-motora após 7 dias de lesão. O potencial antioxidante da própolis vermelha é explicado principalmente pela concentração de flavonoides e compostos fenólicos presentes nos extratos (MACHADO *et al.*, 2016). O quantitativo destes compostos depende de muitos fatores, entre eles, a região onde as amostras são adquiridas, que sofrem influências sazonais e ambientais. A própolis vermelha produzida na região Nordeste do Brasil,

especificamente no Estado de Alagoas, tem apresentado a maior concentração de compostos fenólicos e flavonoides, segundo REIS *et al.* (2019).

Devequi-nunes *et al.*, (2018), obtiveram EHPV com concentração 48% e 23% maior de compostos fenólicos que extratos etanólicos obtidos com as própolis marrom e verde, respectivamente. Já quanto às concentrações de flavonoides, os extratos etanólicos da própolis vermelha possuem um quantitativo superior de 84,13% e 29,56% em comparação com as própolis marrom e verde, nesta ordem.

Os principais flavonoides encontrados na própolis vermelha são biochanina A, daidzeína, formononetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina (PICOLLOTO *et al.*, 2019). As estruturas moleculares destas substâncias estão apresentadas na Figura 3.

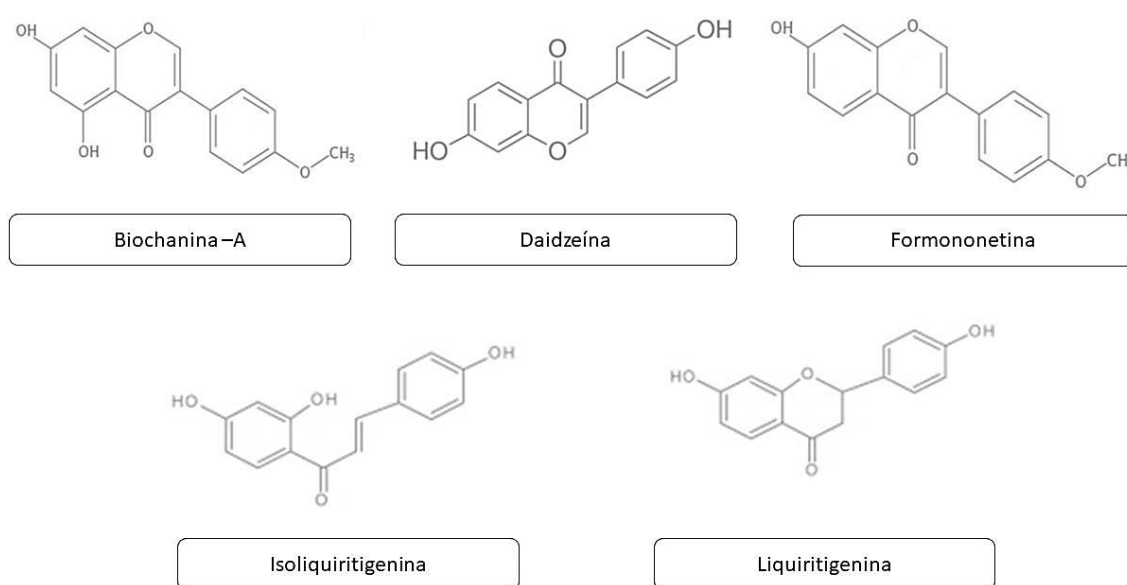


Figura 3. Estruturas moleculares dos principais flavonoides encontrados no extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV).

Dentre estas isoflavonas, a formononetina é a que se apresenta em maior quantidade nos extratos de própolis vermelha (RIBEIRO *et al.*, 2015; NEVES *et al.*, 2016; REIS *et al.*, 2019). Na sequência tem-se a biochanina A e daidzeína, em menores concentrações quando comparados à formononetina (RIBEIRO *et al.*, 2015).

A formononetina é descrita na literatura como um dos metabólitos secundários responsáveis pelas ações anti-inflamatória, antioxidante, antinociceptiva e neuroprotetora (LI *et al.*, 2014; CAVENDISH *et al.*, 2015).

1.3.2 Biomateriais utilizados na neuroregeneração

São reconhecidos como materiais que conseguem ficar em íntimo contato com os fluidos corporais (PIRES *et al.*, 2015). Podem ser de origem natural ou sintética, que possuem

características de biocompatibilidade e biodegradabilidade, o que os tornam ótimos candidatos para a engenharia biomédica ou para carrear fármacos, tornando-se um sistema de liberação *in situ*. A engenharia biomédica utiliza os biomateriais para tratamento de diversas patologias neurológicas, hematológicas, cardíacas, odontológicas, gastrointestinais, renais, hepáticas, pancreáticas e outras (PIRES *et al.*, 2015). No entanto, o presente estudo tem como foco o uso de biomateriais para tratar a LME e assim promover a neurorregeneração.

Dentre os principais biomateriais atuantes na neurorregeneração encontram-se GelMA, imidazol-poli (organofosfazenos), hidrogel de ácido hialurônico, hidrogel de alginato de cálcio (HONG *et al.*, 2017; GALLI *et al.*, 2018; GEISSLER *et al.*, 2018; NOVAIS *et al.*, 2021).

A maioria deles se apresentam na forma de hidrogéis, mimetizando as propriedades físico-químicas (propriedades mecânicas, pH, isotonia) da matriz extracelular do SNC. Tais formulações podem conter fármacos, tornando-se um sistema de liberação. Assim consegue-se aprimorar a propriedade de regenerar o tecido e modular a inflamação (SHIN *et al.*, 2018). Diante disso, foram apresentados abaixo estudos que desenvolveram hidrogéis para tratamento de lesões no tecido nervoso.

Hong *et al.* (2017) apresentaram em seu estudo a possibilidade de utilizar um hidrogel à base de imidazol-poli (organofosfazenos), um polímero sintético, para o tratamento de lesão medular. O hidrogel injetável continha taxol e nanopartículas de siRNA, que foram aplicados em animais lesionados na coluna vertebral a nível de T10 e T11. A avaliação da recuperação motora se deu pelo protocolo de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB), onde foi demonstrado que em 7 dias após o tratamento, os animais apresentaram pontuação 8 na escala de BBB (total de 21 pontos). Os animais apresentaram após 8 semanas crescimento neuronal, detectado por avaliação histológica e imunoistoquímica.

O desenvolvimento de hidrogéis constituído de colágeno, ácido hialurônico e laminina para o tratamento da LME em neonatos foi descrito por Geissler *et al.* (2018). Estes hidrogéis foram preparados contendo células-tronco progenitoras neurais. Os autores demonstraram que os biomateriais utilizados promoveram um aumento significativo na diferenciação de oligodendrócitos e a recuperação motora dos animais. Os animais tratados somente com o hidrogel apresentaram recuperação motora, fato explicado pela semelhança deste hidrogel com a matriz extracelular (MEC) do tecido neural de neonatos. No estudo de Galli *et al.* (2018) foi apresentado o hidrogel de alginato de cálcio para regeneração após lesão. Foram fabricados implantes e administrados em animais com LME entre T9 e T10. Após 14 dias do tratamento, pode-se observar uma recuperação motora significativa, onde os animais tratados com o hidrogel de alginato de cálcio, demonstraram pontuação superior a 13 na escala BBB.

As análises por meio de imunoistoquímica demonstraram que o implante apresentou capacidade neuroprotetora, pois foi observada redução da desmielinização e inflamação.

Para o tratamento da LME, He *et al.* (2019) apresentaram um hidrogel injetável obtido pela mistura polimérica de ácido hialurônico (glicosaminoglicanas componentes da MEC) e metilcelulose formando o denominado HAMC. Os resultados demonstram que o hidrogel HAMC pode promover a regeneração axonal, reduzindo os danos secundários como inflamação, além de propiciar um local para viabilização de células neurais.

No entanto, os estudos mais promissores não só na área neurorregenerativa, mas em toda área da medicina regenerativa, são os que utilizam hidrogéis obtidos com polímeros metacrilados, principalmente metacrilamida (HPMA), hidrogéis poliméricos a base de poli (metacrilato de 2-hidroxietila pHEMA), hidrogel do copolímero 2- hidroxietil metacrilato (HEMA) e hidrogel de gelatina metacrilada GelMA. A principal função dos grupos metacrílicos inseridos em polímeros biocompatíveis é torná-los viáveis do ponto de vista da formação de hidrogéis consistentes, similares às características mecânicas da MEC. A metacrilção destes polímeros visa a produção de novos biomateriais atóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis tornando-os excelentes candidatos para atuar como andaimes e promover a regeneração tecidual (JENDELOVA, 2018). Neste contexto, a gelatina metacrilada tem sido o polímero mais utilizado na engenharia tecidual, pois permite o crescimento celular tridimensional (WANG *et al.*, 2017; FAN *et al.*, 2018; VASCONCELOS *et al.*, 2020; NOVAIS *et al.*, 2021).

1.3.2.1 Gelatina metacrilada GelMA

A gelatina é obtida pela desnaturação e hidrólise do colágeno, sendo a gelatina do tipo A (origem suína) a mais utilizada para estudos que envolvem materiais biocompatíveis (WANG *et al.*, 2017).

A gelatina pode ser metacrilada (GelMA) a fim de possibilitar a formação de hidrogéis reticuláveis (BAS *et al.*, 2015). A GelMA é formada pela interação da gelatina com o anidrido metacrílico (AM), formando dessa forma um pré-polímero (Figura 4). O AM para reticulação da gelatina foi sugerido pela primeira vez por Van Den Bulcke *et al.* (2000), como alternativa ao formaldeído, que apresenta maior citotoxicidade e inviabiliza seu uso na engenharia tecidual (YUE *et al.*, 2017).

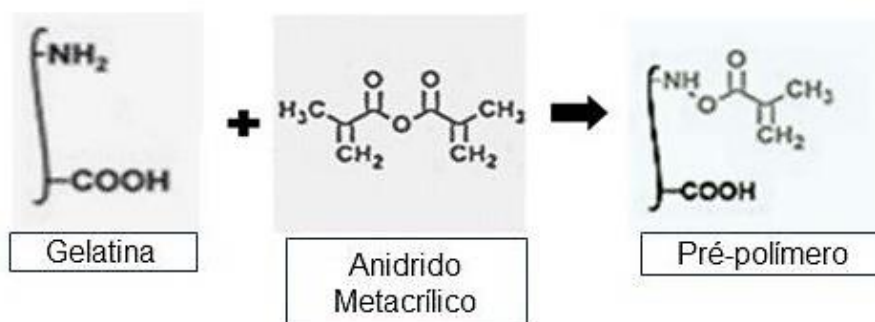


Figura 4. Preparo do pré-polímero.

Para a formação de hidrogel, é necessário que este pré-polímero seja reticulado. O hidrogel de GelMA é obtido pela mistura da solução de GelMA liofilizada (pré-polímero) com um fotoiniciador, e posteriormente exposta a luz ultravioleta (UV) (SUN *et al.*, 2019). O fotoiniciador mais utilizado é o Irgacure 2959, por apresentar maior compatibilidade citológica, e não ser necessário maior tempo de exposição à radiação para que ocorra a fotopolimerização (PAHOFF *et al.*, 2019) (Figura 5). Assim ocorre a formação de hidrogéis fotopolimerizáveis, que podem ser administrados na área desejada, formando uma estrutura 3D, interessante para o crescimento celular (FAN *et al.*, 2018).

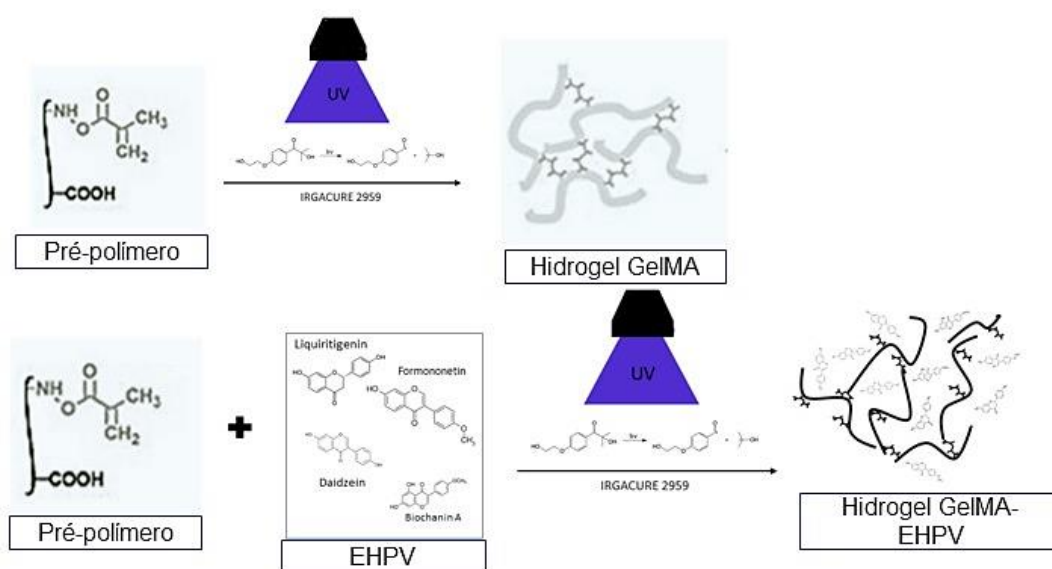


Figura 5. Formação dos hidrogéis.

A GelMA é comumente utilizada em estudos de cultivo celular, por apresentar em sua composição arginina-glicina-aspartato (RGD) e metaloproteinase (MMP), que favorece a fixação, proliferação e remodelação celular. Características interessantes, tais como semelhança com MEC, que apresenta colágeno na sua constituição, biocompatibilidade,

biodegradabilidade, baixo custo, fácil manipulação e capacidade de carrear fármaco fazem deste biomaterial um excelente adjuvante no tratamento *in situ* da lesão medular. O hidrogel utilizado como veículo possibilita a entrega de compostos proteicos, nucleotídeos, polissacarídeos e compostos bioativos como fármacos e produtos naturais (AHADIAN *et al.*, 2015; DEPALLE *et al.*, 2015; RIFAI *et al.*, 2015; KLOTZ *et al.*, 2016).

Dentro desse contexto, o hidrogel de GelMA pode ser usado para o tratamento de diversas patologias, a exemplo da LME. No entanto, alguns fatores são primordiais para sua utilização, como a capacidade de intumescimento do hidrogel, degradabilidade e capacidade de carrear o fármaco proposto. A degradabilidade do hidrogel é importante, uma vez que o hidrogel ideal é aquele que apresenta tempo de degradação viável para sustentar o arcabouço em que ocorrerá a regeneração, e que tenha baixo intumescimento. Desse modo, acredita-se que o hidrogel de GelMA pode contribuir para a formação de um ambiente capaz de promover adesão, proliferação e regeneração celular durante processo de neuroregeneração (WANG *et al.*, 2018).

Usal *et al.* (2019) desenvolveram filamentos à base de hidrogéis (GelMA e pHEMA) por meio de técnicas de eletrofiação, para guiar o crescimento de células nervosas. Nestes arcabouços houve crescimento significativo de células de Schwann, em lesões de nervos periféricos, tanto nos testes *in vivo* e *in situ*. No estudo de Zhou *et al.* (2018) foi fabricado um hidrogel de GelMA contendo células-tronco neurais. Os resultados demonstraram que houve um aumento na diferenciação celular e da expressão gênica de neurônios, o que consequentemente levou a regeneração axonal.

Fan *et al.* (2018) descreveram a produção de arcabouços à base de hidrogel de GelMA com células-tronco neurais induzidas para o tratamento da LME. Nos resultados dos experimentos *in vivo* foi possível verificar que ocorreu diminuição do processo inflamatório, reconexão axonal e a inibição da formação da cavitação cística, impedindo assim a formação da cicatriz glial.

Arcabouços feitos à base de hidrogel híbrido PEG-GelMA (polietilenoglicol-Gelatina metacrilada) contendo células progenitoras neurais NPCs, injetável foram propostos por Koffler *et al.* (2019). O hidrogel demonstrou potencial para regeneração axonal e redução do processo inflamatório. Os autores ainda descreveram que foi possível verificar a existência de respostas positivas dos astrócitos, sem que isso causasse bloqueio na reconexão axonal.

1.3.3 Nanotubos de carbono na neuroregeneração

A tecnologia em nanoescala (que utiliza material particulado com dimensões entre 1-100 nm) é chamada de nanotecnologia. A redução no tamanho de uma partícula é capaz de

causar alterações positivas nas propriedades físico-químicas desses materiais (BHUSHAN *et al.*, 2017).

Os nanotubos de carbono (NTC) são materiais em nanoescala constituídos de um elemento alótropo de carbono. Em termos de estrutura, os NTC estão dispostos em uma ou mais camadas de grafeno que de acordo com sua orientação relacionada ao eixo podem formar junções cilíndricas, seguindo três tipos de geometrias (MONEA *et al.*, 2019) descritas na (Figura 6).

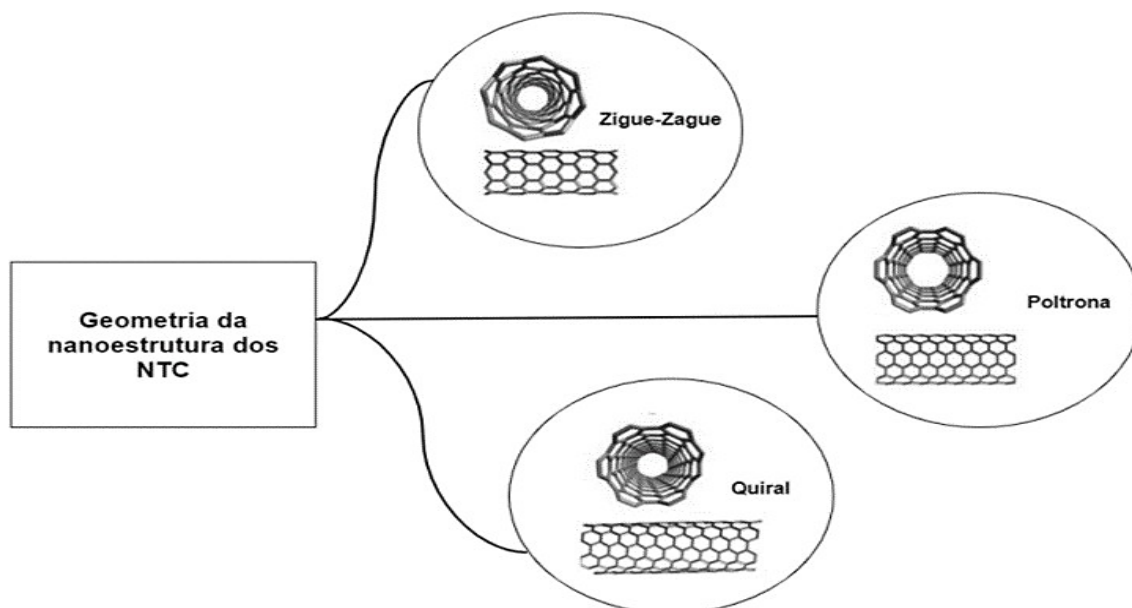


Figura 6. Tipos de geometrias das nanoestruturas dos nanotubos de carbono.

Os NTC ainda podem ser classificados em três tipos, a depender da sua disposição, podendo ser de parede simples (SWNTC), parede dupla (DWNTC), ou parede múltipla (MWNTC) (JOHN *et al.*, 2015; MONEA *et al.*, 2019). A descrição de cada tipo encontra-se no (Quadro 1).

Quadro 1. Tipos de nanotubos de carbono, ilustração e breve descrição

TIPO	ILUSTRAÇÃO	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIA
SWNTC		Consiste em uma camada de grafeno enrolada em um cilindro.	JOHN <i>et al.</i> , 2015 JACOBSEN <i>et al.</i> , 2017 MONEA <i>et al.</i> , 2019
DWNTC		Duas camadas de grafeno enroladas em cilindro sobrepostas.	JOHN <i>et al.</i> , 2015 JACOBSEN <i>et al.</i> , 2017
MWNTC		Múltiplas camadas de grafeno enroladas em cilindro sobrepostas.	JOHN <i>et al.</i> , 2015 JACOBSEN <i>et al.</i> , 2017 MONEA <i>et al.</i> , 2019

As características químicas dos NTC envolvem a sua hibridização sp^2 , ou seja, ligações entre os carbonos dispostos na camada de grafeno, sendo ligações duplas que permitem a sua forma hexagonal. São insolúveis em solventes aquosos sendo classificados como materiais hidrofóbicos. Além disso, ele possui um alto índice de toxicidade e pode vir a causar inflamação e estresse oxidativo nas células teciduais, devido sua baixa dispersibilidade (VASCONCELOS *et al.*, 2020).

No entanto, essas características químicas podem ser alteradas por meio da modificação química ou funcionalização, que ocorre de maneira covalente ou não covalente (MONEA *et al.*, 2019). As propriedades físico-químicas podem ser atenuadas ou não dependendo do tipo de NTC. A funcionalização é um método de ancoramento de átomos ou moléculas às superfícies dos tubos, de forma a anexar neles grupos químicos, possibilitando a transmissão das propriedades biológicas do grupo funcional às nanoestruturas, propiciando então sua aplicação (CIRILLO *et al.*, 2011).

Após sua funcionalização e devido às suas propriedades ópticas, químicas, mecânicas, eletrônicas e estruturais, (KUMAR *et al.*, 2017), estes nanocompósitos podem ser utilizados como agentes carreadores de fármacos, na engenharia de tecidos, na medicina regenerativa e como sensores (Figura 7) (MOHAJERI *et al.*, 2018).

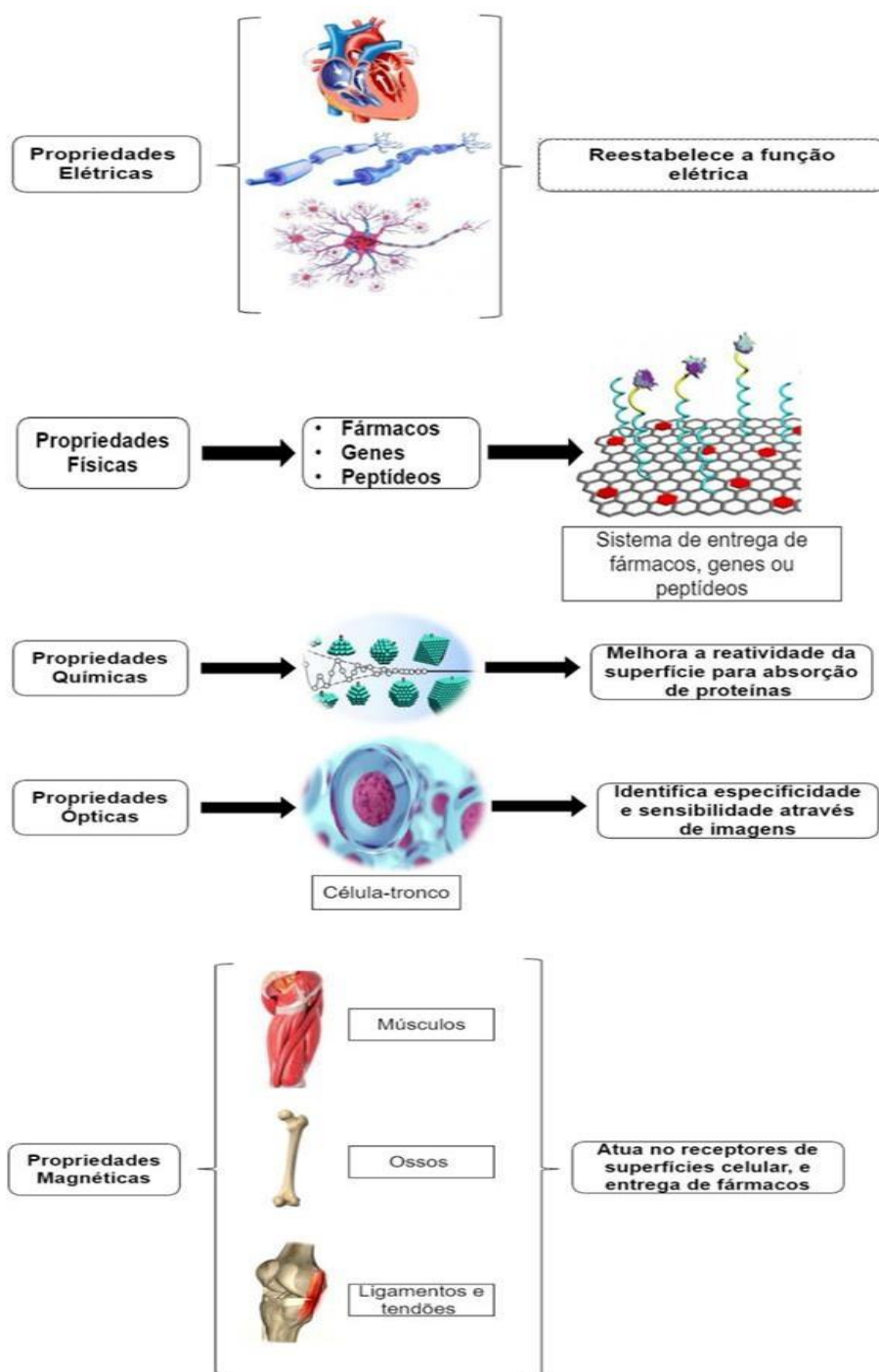


Figura 7. Aplicações da nanotecnologia de acordo com as propriedades do material em escala nanométrica (YANG *et al.*, 2019).

Na área biomédica, diversos trabalhos têm sido publicados. Baldo *et al.* (2016) observaram que a partir da funcionalização do NTC com dióxido de silício houve a formação de um sistema biossensorial com alta especificidade na detecção de Arginase-1, a qual está associada à diferentes patologias, como linfoma e mieloma. Liu *et al.* (2021) demonstraram que o revestimento de nanotubos de carbono a partir de ligas de magnésio AZ91D, fosfato de cálcio e quitosana apresentou resultados positivos na promoção do crescimento de neurônios

da raiz dorsal de ratos, sugerindo que o NTC revestido forma um ambiente mais adequado para o desenvolvimento destas células, auxiliando no reparo tecidual.

Entre as propriedades destes materiais, duas são mais abordadas na área da saúde, tais como, propriedades químicas e elétricas. As propriedades químicas tornam os NTC capazes de carrear fármacos devido serem passíveis de funcionalização com estas moléculas, atuando como transportadores de fármacos. Em relação às propriedades elétricas, os NTC apresentam morfologia cilíndrica semelhantes à dos dendritos neuronais com nuvem eletrônica gerada pelas ligações π , sendo capazes de favorecer a condutividade elétrica e por consequência a reconexão do impulso nervoso (FABBRO *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2017; KURBANOGLU e OZKAN, 2018). Por apresentarem propriedades elétricas, os NTC são amplamente estudados para o tratamento de doenças na área regenerativa, a exemplo da LME.

Ding *et al.* (2015) utilizaram o NTC de parede múltipla para criar um sistema de entrega de fatores de crescimento celular, em modelo de lesão em ratos, tendo o intuito de demonstrar a contribuição dos NTC no efeito neuroprotetivo. O estudo *in vivo* de Imani *et al.* (2016) apresentou regeneração axonal em roedores, utilizando um nanocompósito formado por NTC de parede múltipla na forma de um nanofio.

Zhou *et al.* (2018) desenvolveram um nanosistema a partir de fumarato de policaprolactona e NTC para atuar na regeneração axonal e crescimento celular. Neste estudo foi demonstrado que o biomaterial criou arcabouço para a proliferação celular e o NTC incorporado atuou na elevação da eletricidade do meio, causando aumento na taxa de crescimento, migração e formação de células responsáveis pela sinapse nervosa, o que por consequência leva ao crescimento de axônios e neurorregeneração.

A combinação do hidrogel de polietilenoglicol e NTC de paredes múltiplas foi estudada por Imaninezhad *et al.* (2018) para fabricar um eletrocondutor. O objetivo do nanocompósito foi atuar na regeneração nervosa, o qual apresentou um aumento considerável na condução elétrica, causando o aumento e o crescimento de células neuríticas, o que contribuiu para o reparo nervoso e regeneração. Lee *et al.* (2018) descreveram em seu estudo a utilização de NTC incorporados à arcabouços poliméricos para entrega e potencialização de células-tronco para o tratamento de nervos danificados. NTC de paredes múltiplas (MWNTC) potencializam estímulos elétricos, os quais são cruciais para o desenvolvimento de células nervosas. Os resultados descritos pelos autores demonstram que esse conjunto de biomaterial como arcabouço para as células-troncos incorporados com NTC, promoveram eletricidade ideal para o crescimento e diferenciação de neurites, promovendo assim a regeneração neural.

Nanotubos de carbono funcionalizados com poliuretano para o reparo de nervos foi desenvolvido por Shrestha *et al.* (2019). O objetivo foi estimular o crescimento de células de

Schwann por meio da eletroestimulação. Os resultados obtidos apresentaram uma maior reparação de nervos periféricos e neuroregeneração.

Segundo Koppes *et al.* (2016), a utilização hidrogéis 3D contendo NTC de parede simples demonstrou regeneração axonal em modelo murino. Foi possível observar crescimento de células neurais consequente do aumento da condutividade atribuídas às propriedades físico-químicas dos NTC. Desse modo, hidrogéis em conjunto com NTC podem se tornar aliados para tratamentos inovadores da LME, pois essa associação aumenta ainda o potencial regenerativo dos biomateriais e nanomateriais.

Como demonstrado em estudos citados, a junção dos NTC com biomateriais a exemplo dos hidrogéis de GelMA é estratégia interessante para o tratamento da lesão medular. Aliado a isso, adiciona-se a funcionalização do NTC com moléculas anti-inflamatórias (EHPV) capazes de agir como substâncias neuroprotetoras. O sistema formado destes três elementos torna-se promissor para entrega de fármaco na área de lesão, favorecendo a proliferação celular pela estrutura 3D do biomaterial. Promove ainda a regeneração axonal pela alta atividade elétrica dispersa na área. Assim, o presente estudo propõe a funcionalização dos nanotubos com flavonoides presentes no EHPV, associados ao hidrogel de GelMA para tratamento da lesão medular conforme observado na Figura 8.

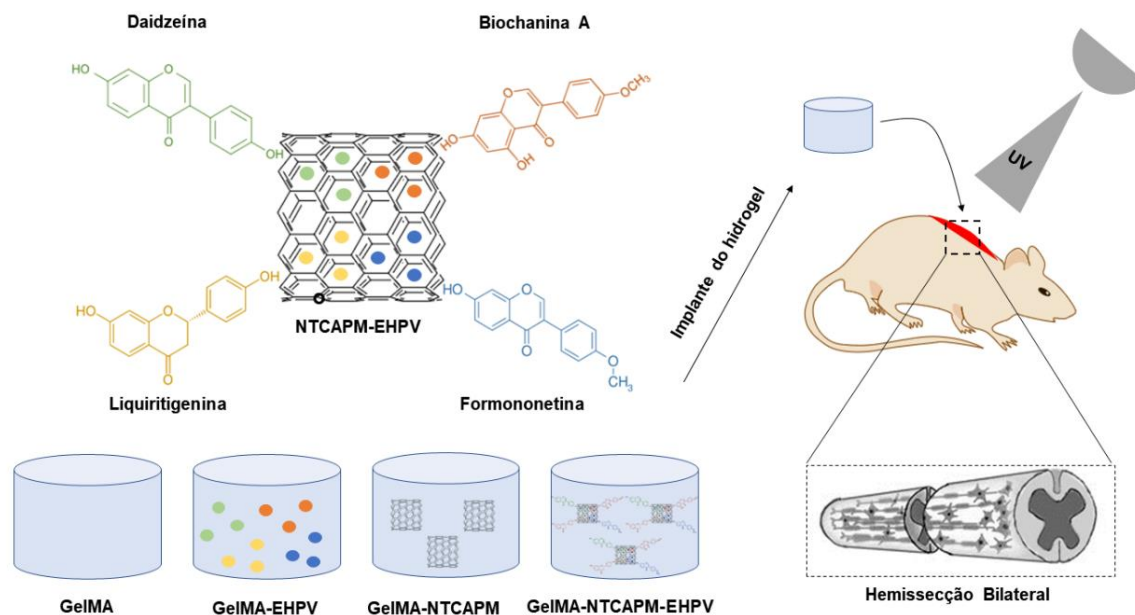


Figura 8. Implante do hidrogel de gelatina metacrilada (GelMA) contendo nanotubo de carbono (NTC) funcionalizado com extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV) *in situ* em modelo de hemisseção bilateral da Medula espinal.

REFERÊNCIAS

- AHUJA, C.S.; NORI, S.; TETREAUULT, L.; WILSON, J.; KWON, B.; HARROP, J.; CHOI, D.; FEHLINGS, M.G. Traumatic Spinal Cord Injury-Repair and Regeneration. *Nature Reviews Disease Primers*, 2017; 3 (17018): 1-21.
- ANJUM, A.; YAZID, M.D.; DAUD, M.F.; IDRIS, J.; HWEI NG, A.M.; NAICKER, A.S. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. *Molecular sciences* 2020; 21:7533.
- BALDO, S. *et al.* Carbon nanotube-based sensing devices for human Arginase-1 detection. *Sens. Bio-Sens. Res*, 2016; 7: 168–173.
- BARBOSA, R. A; NUNES, T.L., NUNES, T.L.; DA PAIXÃO, A.O.; BELO, N. R.; MOURA, S. ALBUQUERQUE JR, R. L. C.; CÂNDIDO, E.A.; PADILHA, F.F.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; GOMES, M. Z.; CARDOSO, J.C. Hydroalcoholic extract of red propolis promotes functional recovery and axon repair after sciatic nerve injury in rats. *Pharm Biol* 2015; 54:993-1004.
- BARROS, T. E. P. F.; ARAUJO, F. F. D.; HIGINO, L. D. P.; MARCON, R.; CRISTANTE, A. F. The effect of monosialoganglioside (GM-1) administration in spinal cord injury. *Acta ortopedica brasileira* 2016; 24 (3): 123-126.
- BAS, O.; PARDO, E.M.J.; CHHAYA, M.P.; WUNNER, F.M.; JEON, J.E.; KLEIN, T.J. *et al.* Enhancing structural integrity of hydrogels by using highly organised melt electrospun fibre constructs. *European Polymer Journal* 2015; 1-13.
- BATISTA, C.M.; ALVES, A.V.F.; QUEIROZ, L.A.; LIMA, B.S.; ARAÚJO, A.A.S.; BAZMANDEGAN, G.; BOROUSHAKI, M.T.; SHAMSIZADEH, A.; AYOABI, F.; HAKIMIZADEH, E.; ALLAHTAVAKOLI, M. Brown propolis attenuates cerebral ischemia-induced oxidative damage via affecting antioxidant enzyme system in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 85: 503-510.
- BEL, E.A.D.; SILVA, C.A.; MLADINIC, N. The Spinal Cord Injury. *Coluna-columna* 2009; 8(4): 441-9. BERTASSONI, L.E.; CARDOSO, J.C.; MANOHARAN, V.; CRISTINO, A.L.; BHISE, N.S.; BHUSHAN, B. Introduction to nanotechnology. In: Springer handbook of nanotechnology. *Springer, Berlin, Heidelberg* 2017;1-19.
- BICAN, O.; MINAGAR, A.; PRUITT, A.A. A The Spinal Cord: A Review of Functional Neuroanatomy. *Neurologic Clinic* 2013; 31(1): 1-18.
- BRACKEN, M.B.; SHEPARD, M.J.; HOLFORD, T. R.; LEO-SUMMERS, L.; ALDRICH, E.F.; FALZ, M.; *et al.* Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury: results of the third national acute spinal cord injury randomized controlled trial. *Jama* 1997; 277 (20): 1597-1604.
- CAVENDISH, R.L.; SOUZA, J.S.; NETO, R.B.; PAIXÃO, A.O.; OLIVEIRA, J.V.; ARAUJO, E.D.; *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *Journal of ethnopharmacology* 2015; 173: 127-133.
- CHOW, D.S.L.; TENG, Y.; TOUPS, E.G.; AARABI, B.; HARROP, J.S.; SHAFFREY, C.I.; *et al.* Pharmacology of riluzole in acute spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery: Spine* 2012; 17: 129-140.

CIRILLO G. *et al.* Antioxidant multi-walled carbon nanotubes by free radical grafting of gallic acid: New materials for biomedical applications: Antioxidant CNT by free radical grafting. *J Pharm Pharmacology* 2011.

COUILLARD-DESPRES, S.; BIELER, L.; VOGL, M. Pathophysiology of traumático espinal medula lesão. Aspectos neurológicos da lesão medular. Springer; Cham, Suíça 2017; 503–528.

DANTAS SILVA, R.P.; MACHADO, B.A.S.; BARRETO, G.D.A.; COSTA, S.S.; ANDRADE, L.N.; AMARAL, R.G.; *et al.* Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *Plos one* 2017; 12(3): 0172585.

DEPALLE, B.; QIN, Z.; SHEFELBINE, S.J.; BUEHLER, M.J. Influence of cross-link structure, density and mechanical properties in the mesoscale deformation mechanisms of collagen fibrils. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2015; 52: 1-13.

DEVEQUI-NUNES, D.; MACHADO, B.A.S.; BARRETO, G.D.A.; REBOUÇAS SILVA, J.; SILVA, D.F.; ROCHA, J.L.C.; *et al.* Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS One* 2018; 13 (12): e0207676.

DIMITRIJEVIC, M.R.; DANNER, S.M.; MAYR, W. Neurocontrol of movement in humans with spinal medoir. *Artif. Órgãos* 2017; 39 :823–833.

EVANIEW, N.; BELLEY-CÔTÉ, E.P.; FALLAH, N.; NOONAN, V.K.; RIVERS, C.S.; DVORAK, M.F. Methylprednisolone for the treatment of patients with acute spinal cord injuries: a systematic review and meta-analysis. *Journal of neurotrauma* 2016; 33 (5): 468- 481.

FABBRO, A.; PRATO, M.; BALLERINI, L. Carbon nanotubes in neuroregeneration and repair. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2013; 65 (15) 2034-2044.

FAN, L.; LIU, C.; CHEN, X.; ZOU, Y.; ZHOU, Z.; LIN, C.; WANG, Q. Directing induced pluripotent stem cell derived neural stem cell fate with a three-dimensional biomimetic hydrogel for spinal cord injury repair. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2018; 10(21), 17742– 17755.

FEHLINGS, M.G.; VACCARO, A.; WILSON, J.R.; SINGH, A.; CADOTTE, W.; HARROP, J.S. *et al.* Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS). *Plos One* 2012; 7(2): 1-8.

GALLI, R.; SITOCI-FICICI, K.H.; UCKERMANN, O.; LATER, R.; MAREČKOVÁ, M.; KOCH, M.; *et al.* Label-free multiphoton microscopy reveals relevant tissue changes induced by alginate hydrogel implantation in rat spinal cord injury. *Scientific reports* 2018; 8 (1): 1-13.

GAZDIC, M.; VOLAREVIC, V.; HARRELL, C. R.; FELLABAUM, C. JOVICIC, N.; ARSENIJEVIC, N.; STOJKOVIC, M. Stem cells therapy for spinal cord injury. *International journal of molecular sciences* 2018; 19(4) :1039; 2018.

GEISLER, S.A.; SABIN, A.L.; BESSER, R.R.; GOODEN, O.M.; SHIRK, B.D.; NGUYEN, Q.M.; *et al.* Biomimetic hydrogels direct spinal progenitor cell differentiation and promote functional recovery after spinal cord injury. *Journal of neural engineering* 2018; 15(2): 025004.

GENSEL, J.C; ORR, M.B. Interactions of primary insult biomechanics and secondary cascades in spinal cord injury: implications for therapy. *Neural Regeneration Research* 2017; 12(10): 1618-1619.

GUO, B.; LIAO, C.; LIU, X.; Yi, J. Preliminary study on conjugation of formononetin with multiwalled carbon nanotubes for inducing apoptosis via ROS production in HeLa cells. *Drug Design, Development and Therapy* 2018; 12: 2815.

HACHEM, L.D.; AHUJA, C.S.; FEHLINGS, M.G. Assessment and management of acute spinal cord injury: From point of injury to rehabilitation. *The journal of spinal cord medicine* 2017; 40 (6): 665-675.

HAUCK, A.K. & BERNLOHR, D.A. Oxidative stress and lipotoxicity. *J Lipid Res* 2016; 57 (11): 1976-1986.

HE, Z.; ZANG, H.; ZHU, L.; HUANG, K.; YI, T.; ZHANG, S.; CHENG, S. An anti-inflammatory peptide and brain-derived neurotrophic factor-modified hyaluronan-methylcellulose hydrogel promotes nerve regeneration in rats with spinal cord injury. *International journal of nanomedicine* 2019; 14: 721.

HONG, L.T.A.; KIM, Y.M.; PARK, H.H.; HWANG, D.H.; CUI, Y.; LEE, E.M.; YAHN, S.; LEE, J. K.; SONG, S.C.; KIM, B.G. An injectable hydrogel enhances tissue repair after spinal cord injury by promoting extracellular matrix remodeling. *Nature communications* 2017; 8(1) 1-14.

HUSSAIN, T.; TAN, B.; YIN, Y.; BLACHIER, F.; TOSSOU, M.C.; RAHU, N. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016; 2016.

INOUE-SHIBUI, A.; KATO, M.; SUZUKI, N.; KOBAYASHI, J.; TAKAI, Y.; IZUMI, R.; *et al.* Interstitial pneumonia and other adverse events in riluzole-administered amyotrophic lateral sclerosis patients: a retrospective observational study. *BMC neurology* 2019; 19 (1): 72.

JENDELOVA, P. Therapeutic Strategies for Spinal Cord Injury. *International Journal Molecular Sciences* 2018; 19 (10): 3200.

JOHN, A.A.; SUBRAMANIAN, A.P.; VELLAYAPPAN, M.V.; BALAJI, A.; MOHANDAS, H.; JAGANATHAN, S.K. Carbon nanotubes and graphene as emerging candidates in neuroregeneration and neurodrug delivery. *International Journal of Nanomedicine* 2015; 10: 4267.

JUDSON, T.; MIHARA, K. Minocycline-induced Hyperpigmentation. *Journal of general internal medicine* 2017; 32(1) :133-133.

KATOH, H.; YOKOTA, K.; FEHLINGS, M.G. Regeneração da conectividade da medula espinhal por meio do transplante de células-tronco e andaimes de biomateriais. *Frente. Célula. Neurosci* 2019; 13 :248.

KHORASANIZADEH, M.; YOUSEFIFARD, M.; ESKIAN, M.; LU, Y.; Chalangari M., Harrop JS, Rahimi-Movaghar V. Recuperação neurológica após lesão traumática da medula espinhal: uma revisão sistemática e meta-análise. *J. Neurosurg.* 2019; 30: 683–699.

KOCOT, J.; KIELCZYKOWSKA, M.; LUCHOWSKA-KOCOT, D.; KURZEPA, J.; MUSIK, I. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2018; 2018.

KOFFLER, J.; ZHU, W.; QU, X.; PLATOSHYN, O.; DULIN, J.N.; BROCK, J.; *et al.* Biomimetic 3D-printed scaffolds for spinal cord injury repair. *Nature medicine* 2019; 25 (2) 263-269.

KUMAR, S.; RANI, R.; DILBAGHI, N.; TANKESHWAR, K.; KIM, K.-H. Carbon nanotubes: a novel material for multifaceted applications in human healthcare. *Chemical Society Reviews* 2017; 46: 158–196.

KURBANOGU, S.; OZKAN, S.A. Electrochemical carbon based nanosensors: A promising tool in pharmaceutical and biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Review issue* 2018; 147: 439–457.

KWON, S.; LEE, S.S.; SIVASHANMUGAM, A.; KWON, J.; KIM, S.H.L.; NOH, M.Y.; et al. Bioglass-incorporated methacrylated gelatin cryogel for regeneration of bone defects. *Polymers* 2018; 10 (8): 914.

LEE, D.H.; PARK, H.Y.; LEE, U.S.; LEE, K.-J.; NOH, E.C.; JANG, J.H.; KANG, D.-H. The effects of brain wave vibration on oxidative stress response and psychological symptoms. *Comprehensive Psychiatry* 2015; 60 :99–104.

LI, H.; ZHANG, X.; ZHU, X.; QI, X.; LIN, K.; CHENG, L. The effects of icariin on enhancing motor recovery through attenuating pro-inflammatory factors and oxidative stress via mitochondrial apoptotic pathway in the mice model of spinal cord injury. *Frontiers in physiology* 2018; 9: 1617.

LI, Z.; DONG, X.; ZHANG, J.; ZENG, G.; ZHAO, H.; LIU, Y.; et al. Formononetin protects TBI rats against neurological lesions and the underlying mechanism. *Journal of the neurological sciences* 2014; 338 (1-2): 112-117.

LIU, Tingjiao et al. CNTs-CaP/chitosan-coated AZ91D magnesium alloy extract promoted rat dorsal root ganglia neuron growth via activating ERK signalling pathway. *Cell Biochemistry and Function* 2021; 39 (7): 908-920.

MALIK, N.; DHIMAN, P.; SOBARZO-SANCHEZ, E.; KHATKAR, A. Flavonoids and anthraquinones as xanthine oxidase and monoamine oxidase inhibitors: a new approach towards inflammation and oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry* 2018; 18(25): 2154-2164.

MANLEY, N.C.; PRIEST, C.A.; DENHAM, J.; WIRTH, E.D.; LEBKOWSKI, J.S. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cells: preclinical efficacy and safety in cervical spinal cord injury. *Stem cells translational medicine* 2017; 6(10): 1917-1929.

MARCON, R.M.; CRISTANTE, A.F.; BARROS, T.E.P.F.; FERREIRA, R.; SANTOS, G.B. Effects of ganglioside G (M1) and erythropoietin on spinal cord lesions in rats: functional and histological evaluations. *Clinics* 2016; 71(6):351-360.

MESHKINI, A.; SALEHPOUR, F.; AGHAZADEH, J.; MIRZAEI, F.; NASERI, A.S.A. Riluzole can improve sensory and motor function in patients with acute spinal cord injury. *Asian journal of neurosurgery* 2018; 13 (3): 656.

MOHAJERI, M.; BEHNAM, B.; SAHEBKAR, A. Biomedical applications of carbon nanomaterials: Drug and gene delivery potentials. *Journal of Cellular Physiology*. 2018.

MONEA, B.F.; IONETE, E.I.; SPIRIDON, S.I.; ION-EBRASU, D.; PETRE, A.E. Carbon Nanotubes and Carbon Nanotube Structures Used for Temperature Measurement. *Sensors (Basel)* 2019; 19 (11): 2464.

NAGOSHI, N.; KHAZAEI, M.; AHLFORS, J.E.; AHUJA, C.S.; NORI, S.; WANG, J.; *et al.* Human spinal oligodendrogenic neural progenitor cells promote functional recovery after spinal cord injury by axonal remyelination and tissue sparing. *Stem cells translational medicine* 2018; 7(11): 806-818.

NEVES, M.V.M.; SILVA, T.M.S.D.; LIMA, E.D.O.; CUNHA, E.V.L.D.; OLIVEIRA, E.D.J.; *et al.* Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. *Brazilian Journal Of Microbiology* 2016; 47 (1): 159-166.

NI, J.; WU, Z.; MENG, J.; ZHU, A.; ZHONG, X.; WU, S.; NAKANISHI, H. The neuroprotective effects of Brazilian green propolis on neurodegenerative damage in human neuronal SH-SY5Y cells. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017; 2017.

NICHOL, J.W.; KOSHY, S.; BAE, H.; HWANG, C.M.; YAMANLAR, S.; KHADEMHOSEINI, A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* 2010; 31(21): 5536-5544.

NOVAIS, G.B.; SANTOS, D.S.; SANTANA, R.J.R.; FILHO, R.N.P.; CUNHA, J.L.S.; LIMA, B.S. *et al.* Development of a New formulation Based on *in situ* photopolymerized Polymer for the Treatment of Spinal Cord Injury. *Polymers* 2021;13(24):4247.

PAHOFF, S.; MEINERT, C.; BAS, O.; NGUYEN, L.; KLEIN, T. J.; HUTMACHER, D. W. Effect of gelatin source and photoinitiator type on chondrocyte redifferentiation in gelatin methacryloyl-based tissue-engineered cartilage constructs. *Journal of Materials Chemistry B* 2019; 7(10):1761-1772.

PICOLOTTO, A.; PERGHER, D.; PEREIRA, G. P.; MACHADO, K.G.; SILVA BARUD, H.; ROESCH-ELY, M.; *et al.* Bacterial cellulose membrane associated with red propolis as phytomodulator: Improved healing effects in experimental models of diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019; 112: 108640.

PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K.; MORAES, Â.M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Química nova* 2015; 38 (7): 957-971.

QI, C.; YAN, X.; HUANG, C.; MELERZANOV, A.; DU, Y. Biomaterials as carrier, barrier and reactor for cell-based regenerative medicine. *Protein & cell* 2015; 6(9): 638-653.

RAHALI, K., BEN MESSAOUD, G., KAHN, C., SANCHEZ-GONZALEZ, L., KACI, M., CLEYMAND, F. *et al.* Synthesis and Characterization of Nanofunctionalized Gelatin Methacrylate Hydrogels. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017; 18(12), 2675.

RAMOS, R.C.D.V.; ALEGRETE, N. O papel da farmacoterapia na modificação do estado neurológico de traumatizados vértebro-medulares. *Revista Brasileira de Ortopedia* 2015; 50 (6) 617-624.

REIS, J.H.O.; BARRETO, G.D.A.; CERQUEIRA, J.C.; ANJOS, J.P.D.; ANDRADE, L.N.; PADILHA, F.F.; *et al.* Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. *PloS one* 2019; 14(7): e0219063.

REN, X.S.; DING, Wei; YANG, X.Y. Icariin alleviates lipid peroxidation after spinal cord injury in rats. *Journal of Southern Medical University* 2018; 38(6): 711-715.

- RIBEIRO, D.R.; ALVES, Â.V.F.; SANTOS, E.P.; PADILHA, F.F.; GOMES, M.Z.; RABELO, A. S.; *et al.* Inhibition of DMBA-induced oral squamous cells carcinoma growth by brazilian red propolis in rodent model. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2015; 117 (2) 85-95.
- RIFAI, N.A.; HASAN, A.; KOBEISSY, F. Culture of PC12 neuronal cells in GelMa hydrogel for Brain tissue engineering. *International Conference on Advances in Biomedical Engineering* 2015; 254-257.
- ROCHA, L. A.; SOUSA, R.A.; LEARMONTH, D.; SALGADO, A. J. The role of biomaterials as angiogenic modulators of spinal cord injury: mimetics of the spinal cord, cell and angiogenic factor delivery agents. *Frontiers in pharmacology* 2018; 9: 164.
- ROUANET, C.; REGES, D.; ROCHA, E.; GAGLIARDI, V.; SILVA, G.S. Traumatic spinal cord injury: current concepts and treatment update. *Arquivos de neuro-psiquiatria* 2017; 75(6): 387-393.
- SALIM, S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther* 2017; 360 (1): 201–205.
- SÁMANO, C.; NISTRI, A. Mechanism of Neuroprotection Against Experimental Spinal Cord Injury by Riluzole or Methylprednisolone. *Neurochem Res*, 2017.
- SANDROW-FEINBERG, H.R.; HOULÉ, J.D. Exercise after spinal cord injury as an agent for neuroprotection, regeneration and rehabilitation. *Brain research* 2015; 1619: 12-21.
- SHIAO, R.; LEE-KUBLI, C. A. Neuropathic pain after spinal cord injury: challenges and research perspectives. *Neurotherapeutics* 2018; 15 (3): 635-653.
- SHRESTHA, S.; SHRESTHA, B.K.; LEE, J.; JOONG, O.K.; KIM, B.S.; PARK, C.H. *et al.* A conducting neural interface of polyurethane/silk-functionalized multiwall carbon nanotubes with enhanced mechanical strength for neuroregeneration. *Mater Sci Eng C* 2019; 102:511-23.
- SILVA, J.C.; SARAIVA, S.R.G.; OLIVEIRA JUNIOR, R.G.; ALMEIDA, J.R.G.S. Experimental models for evaluation of antinociceptive activity of natural products: a review. *Brazilian Journal of Pharmacy* 2013; 94(1): 18-23.
- SMITH, S.L.; SCHERCH, H.M.; HALL, E.D. Protective effects of tirilazad mesylate and metabolite U-89678 against blood-brain barrier damage after subarachnoid hemorrhage and lipid peroxidative neuronal injury. *Journal of neurosurgery* 1996; 84 (2): 229-233.
- SUMIZONO, M.; SAKAKINA, H.; OTSUKA, S.; TERASHI, T.; NAKANISHI, K.; UEDA, K.; *et al.* The effect of exercise frequency on neuropathic pain and pain-related cellular reactions in the spinal cord and midbrain in a rat sciatic nerve injury model. *Journal of pain research* 2018; 11: 281.
- SUN, M.; SUN, X.; WANG, Z.; GUO, S.; YU, G.; YANG, H. Synthesis and properties of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels and their recent applications in load-bearing tissue. *Polymers* 2018; 10(11): 1290.
- UEDA, T.; INDEN, M.; SHIRAI, K.; SEKINE, S.I.; MASAKI, Y.; KURITA, H; *et al.* The effects of Brazilian green propolis that contains flavonols against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity. *Scientific reports* 2017; 7(1): 1-11.

USAL, T.D.; YUCEL, D.; HASIRCI, V. A novel GelMA-pHEMA hydrogel nerve guide for the treatment of peripheral nerve damages. *International journal of biological macromolecules* 2019; 121: 699-706.

VAN DEN BULCKE, A.I.; BOGDANOV, B.; ROOZE, N.; SCHACHT, E.H.; CORNELISSEN, M.; BERGHMANS, H. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* 2000; 1 (1): 31-38.

VASCONCELOS, A.C.P.; MORAIS, R.P.; NOVAIS, G.B.; BARROSO, S.S.; MENEZES, L.R.O.; SANTOS, S.; COSTA, L.P.; CORREA, C.B.; SEVERINO, P.; GOMES, M.Z.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R.L.C.; CARDOSO, J.C. *In situ* photocrosslinkable formulation of nanocomposites based on multi-walled carbon nanotubes and formononetin for potential application in spinal cord injury treatment. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine* 2020; 29:102-272.

VENKATESH, K.; GHOSH, S.K.; MULLICK, M.; MANIVASAGAM, G.; SEN, D. Spinal cord injury: pathophysiology, treatment strategies, associated challenges, and future implications. *Cell and Tissue Research* 2019.

WANG, Y.; MA, M.; WANG, J.; ZHANG, W.; LU, W.; GAO, Y.; *et al.* Development of a photocrosslinking, biodegradable GelMA/PEGDA hydrogel for guided bone regeneration materials. *Materials* 2018; 11(8):1345.

WANG, Z., TIAN, Z., MENARD, F., & KIM, K. Comparative study of gelatin methacrylate hydrogels from different sources for biofabrication applications. *Biofabrication*, 2017; 9(4): 044-101.

WHO. World Health Organization. Spinal Cord Injury. [acessado em 23 ago 2020] Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury>.

WOŹNIAK, B.; WOŹNIAK, A.; MILA-KIERZENKOWSKA, C.; KASPRZAK, H.A. Correlation of Oxidative and Antioxidative Processes in the Blood of Patients with Cervical Spinal Cord Injury. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 6094631.

XU, X.; LI, N.; ZHU, L.; ZHOU, Y.; CHENG, H. Beneficial effects of local profound hypothermia and the possible mechanism after experimental spinal cord injury in rats. *The journal of spinal cord medicine* 2016; 39(2): 220-228.

YANG, Y.; CHAWLA, A.; ZHANG, J.; ESA, A.; JANG, H. L.; KHADEMHOSEINI, A. Applications of nanotechnology for regenerative medicine; healing tissues at the nanoscale. In: Principles of Regenerative Medicine. *Academic Press* 2019; 485-504.

YUE, K.; LI, X.; SCHROBBACK, K.; SHEIKHI, A.; ANNABI, N.; LEIJTEN, J.; *et al.* Structural analysis of photocrosslinkable methacryloyl-modified protein derivatives. *Biomaterials*, 2017.

ZHANG, Q.; ZHANG, L. X.; AN, J.; YAN, L.; LIU, C. C.; ZHAO, J. J.; YANG, H. Huangqin flavonoid extraction for spinal cord injury in a rat model. *Neural regeneration research* 2018; 13 (12): 2200.

ZHOU, X.; CUI, H.; NOWICKI, M.; MIAO, S.; LEE, S. J.; MASOOD, F.; *et al.* Three-dimensional-bioprinted dopamine-based matrix for promoting neural regeneration. *ACS applied materials & interfaces* 2018; 10 (10): 8993-9001.

CAPÍTULO 2

NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE SIMPLES E DE PAREDE MÚLTIPLA FUNCIONALIZADOS POR ISOFLAVONAS

RESUMO

A funcionalização de nanotubos de carbono de parede simples (NTCPS) e nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCPM) com isoflavonas selecionadas (biochanina A e formononetina), ocorreu com objetivo de comparar às propriedades físico-químicas dos conjuntos obtidos. Inicialmente as amostras de NTC foram oxidadas a partir de um tratamento ácido com soluções de ácido nítrico e ácido sulfúrico e na sequência foram funcionalizadas com formononetina (Ft) e biochanina a (BioA), por homogeneização. Os NTC foram caracterizados quanto à sua morfologia por meio de ensaios de dispersibilidade, estabilidade térmica a partir dos testes de microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada em espectrômetro de energia dispersiva (EDS), espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA) e teste de ancoragem de fármacos por meio da cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). O tratamento ácido de NTCPS e NTCPM melhorou a dispersibilidade das amostras em água. Independentemente do ambiente de pH, os NTCPS permaneceram agregados em solução aquosa, mesmo após a funcionalização. A dispersibilidade do NTCPM aumentou após o tratamento ácido (NTCAPM) em ambos os valores de pH testados (4 e 7). A funcionalização foi confirmada pela melhor dispersibilidade dos NTC com todas as isoflavonas utilizadas. NTCAPM e isoflavona 1:1 (p/p) usados para todas as moléculas. A biochanina A apresentou melhor ancoragem em NTCAPM. Observou-se ainda, que os NTCAPM funcionalizados com isoflavonas apresentaram maior estabilidade térmica, além de alterações estruturais em sua superfície e maior nível de oxidação, compatíveis com o ancoramento foram das isoflavonas, evidenciado por FTIR. A ancoragem do fármaco foi vista em ambas as amostras. Concluímos dessa forma, que ambos os NTC seja de parede simples NTCPM como de parede múltipla são eficazes quanto ao processo de funcionalização, no entanto, NTCPM apresentaram melhor estabilidade térmica favorecendo sua aplicabilidade em áreas biomédicas.

Palavras chave: nanotubos de carbono de parede simples; nanotubos de carbono de paredes múltiplas; biochanina A; formononetina; funcionalização.

1 INTRODUÇÃO

Os nanomateriais têm sido estudados em diversas áreas da ciência, incluindo sistemas de liberação de fármacos (PHELANE *et al.*, 2020). Entre os materiais nanoestruturados, os que apresentam dimensões entre 1 e 100 nm, têm sido propostos como sistemas de liberação de fármacos, destacando-se os nanotubos de carbono (NTC). Os NTC são estruturas formadas por átomos de carbono, organizados a partir de folhas de grafeno, estruturados em tubos com um arranjo de átomos de carbono ligados entre si, com hibridização sp^2 (XU; LIANG; DING, 2017; ZHOU; FANG; RAMASAMY, 2019).

O número de folhas de grafeno determina o tipo de NTC obtido, gerando materiais com parede simples (NTCPS), consistindo em uma única camada de grafeno, ou com parede múltipla (NTCPM), formado por várias camadas de grafeno (XIANG *et al.*, 2020) (Figura 1). Os NTC possuem um tamanho de 0,4-100 nm, e quando oxidados exibem uma excelente superfície de contato para ancoragem de fármacos (NETO *et al.*, 2021; MORAIS *et al.*, 2020). Suas superfícies são passíveis de funcionalização, aumentando sua dispersibilidade em meio aquoso, favorecendo seu uso em áreas biomédicas (SAMADISHADLOU *et al.*, 2018; KITTANA *et al.*, 2018).

Os NTCPS foram propostos para engenharia de tecidos cardíacos, para promover a construção e diferenciação cardíaca (YU *et al.*, 2017; PEÑA *et al.*, 2017) enquanto os NTCPM foram propostos para promover o crescimento, proliferação, regeneração de tecidos neurais e ósseos (POULADZADEH *et al.*, 2018; SHRESTHA *et al.*, 2019).

O caráter hidrofóbico dos NTC resulta em sua baixa dispersibilidade em fluidos biológicos, com tendência a agregar-se em redes emaranhadas por interações de van der Waals, perdendo sua dimensão nano. Portanto, seus usos tornam-se inadequados, com aumento da toxicidade devido à ativação do sistema imunológico por partículas maiores. (SALIEV, 2019). A busca de estratégias para aumentar e manter sua dispersibilidade em meio aquoso é necessária, a fim de evitar a aglomeração de moléculas e consequentemente reduzir a toxicidade dos NTC (MORAIS *et al.*, 2020).

A estratégia mais comum usada para melhorar a dispersibilidade do NTC é conhecida como funcionalização. Este processo quebra as ligações de carbono sp² em ligações sp³ e permite a inserção de grupos funcionais na superfície do NTC. Após a funcionalização, o nanomaterial permanece disperso e imperceptível ao sistema imunológico (ZHOU; FANG; RAMASAMY, 2019).

Os NTC podem ser funcionalizados covalentemente pela adição de grupos funcionais, envolvendo a presença de novos elementos, como oxigênio e nitrogênio. A funcionalização também pode ser realizada por interações não covalentes, por meio da adsorção física de moléculas (PUNETHA *et al.*, 2017).

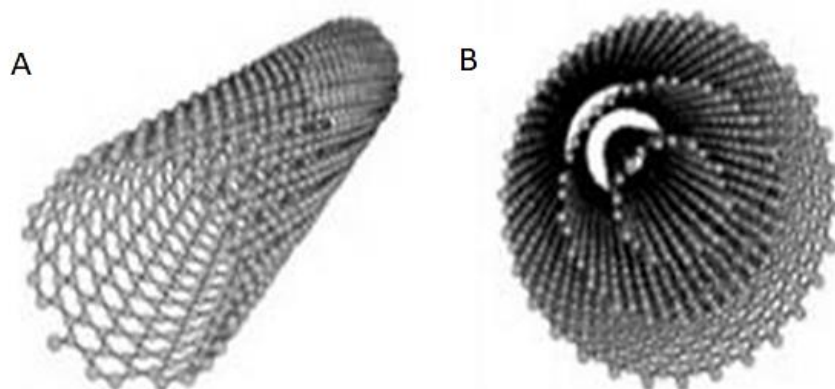


Figura 1. A. Nanotubo de carbono de parede simples (NTCPS); B. Nanotubo de carbono de paredes múltiplas (NTCPM).

Geralmente, para funcionalização de NTC são utilizados polímeros a exemplo de GelMA, ácido hialurônico, quitosana, poliuretano, entre outros (SHERESTHA *et al.*, 2019; STEEL *et al.*, 2020; VASCONCELOS *et al.*, 2020). Recentemente, os NTC têm sido funcionalizados com fármacos, sendo considerados uma ferramenta potencial para desenvolver novas estratégias para liberação direcionada (BARREJÓN *et al.*, 2021). Ambos os tipos de NTC podem ser usados em associação com fármacos (NETO *et al.*, 2021; MORAIS *et al.*, 2020). Cirillo *et al.* (2011) relataram a funcionalização de NTCPM usando ácido gálico por enxerto de radicais livres. Moraes *et al.* (2020) estudaram o NTCPM funcionalizado com naringenina para o tratamento do câncer de pulmão, confirmando a redução da toxicidade do NTCPM-naringenina em relação ao NTCPM livre, demonstrando também uma melhora do efeito anticancerígeno sobre células malignas A549. Vasconcelos *et al.* (2020) e Guo *et al.* (2018) estudaram NTCPM funcionalizado com formononetina, uma isoflavona com ação anti-inflamatória, para desenvolver um novo sistema de liberação de fármacos.

As isoflavonas são compostos polifenólicos de origem natural, com quinze átomos de carbono formando um esqueleto de difenilpropano com dois anéis benzênicos (anel A e B) ligados a um anel pirano (anel C) (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). Nessa classe de moléculas, destacam-se a biochanina A (BioA) e a formononetina (Ft) (Figura 2). Biochanina A (5,7-dihidroxi-3-(4-metoxifenil)cromen-4-ona) e formononetina (7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona) são isoflavonas naturais encontradas na própolis vermelha (BEZERRA *et al.*, 2017; NOVAIS *et al.*, 2021) e no trevo vermelho (*Trifolium pratense*) (MALCA-GARCIA *et al.*, 2019). Ambas (Ft e BioA) são consideradas fitoestrógenos e podem ser usadas como suplementos na menopausa (CHEDRAUI *et al.*, 2008; SUDHA; SAMEENA; ENOCH, 2016). A BioA possui atividade anti-hiperglicêmica (HARINI; EZHUMALAI; PUGALENDI, 2012), antiproliferativa (HSU *et al.*, 2018), antimicrobiana (NIKOLIC *et al.*, 2018) e anti-inflamatória

(KOLE *et al.*, 2011). Ft é considerado um fármaco anti-proliferativo de células tumorais, induzindo a apoptose em cânceres de mama, próstata, colo do útero e linhagens celulares de osteossarcoma (LI *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2014). Atua também como um fármaco anti-inflamatório associado à sua atividade antioxidante (CAVENDISH *et al.*, 2015). O extrato da própolis vermelha (EHPV) é rico em ambas as isoflanovas, e, portanto, possui atividades biológicas relacionadas às moléculas (NOVAIS *et al.*, 2021).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a eficiência da funcionalização comparando os tipos de nanotubos de carbono (NTCPS e NTCPM) utilizando as isoflavonas (Bio-A e Ft) visando a obtenção de sistemas de liberação de fármacos.

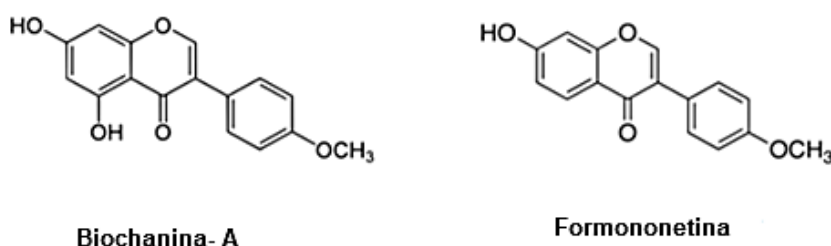


Figura 2. Isoflavonas presentes no EHPV: biochanina A e formononetina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Nanotubos de carbono (NTCPS e NTCPM), isoflavonas (biochanina A e formononetina) e tampões foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os ácidos nítrico e sulfúrico foram adquiridos à Labsynth (São Paulo, Brasil). Água bidestilada foi utilizada após filtração em sistema Milli-Q da millipore.

2.2 Funcionalização de nanotubos de carbono

A funcionalização dos NTC foi realizada utilizando a metodologia descrita por Vasconcelos *et al.* (2020) conforme resumido na Figura 3. Resumidamente, os NTC (NTCPS e NTCPM) foram submetidos a uma etapa de oxidação utilizando uma solução ácida (15% de ácido nítrico e 15% de ácido sulfúrico) durante 24 h. Após esse período, as amostras foram lavadas com água destilada para atingir pH 7,0. Os materiais obtidos foram secos (100 °C/24 h) e denominados NTCAPS e NTCAPM. A etapa de funcionalização utilizando isoflavonas (Ft e BioA) foi realizada misturando as amostras de isoflavonas (10 mg, Ft e BioA) e NTCA (10

mg, NTCAPS ou NTCAPM) em 1 mL de água e homogeneizadas por 3 h a 25 °C. Obtendo-se as amostras NTCAPS-BioA; NTCAPS-Ft; NTCAPM-BioA e NTCAPM-Ft.

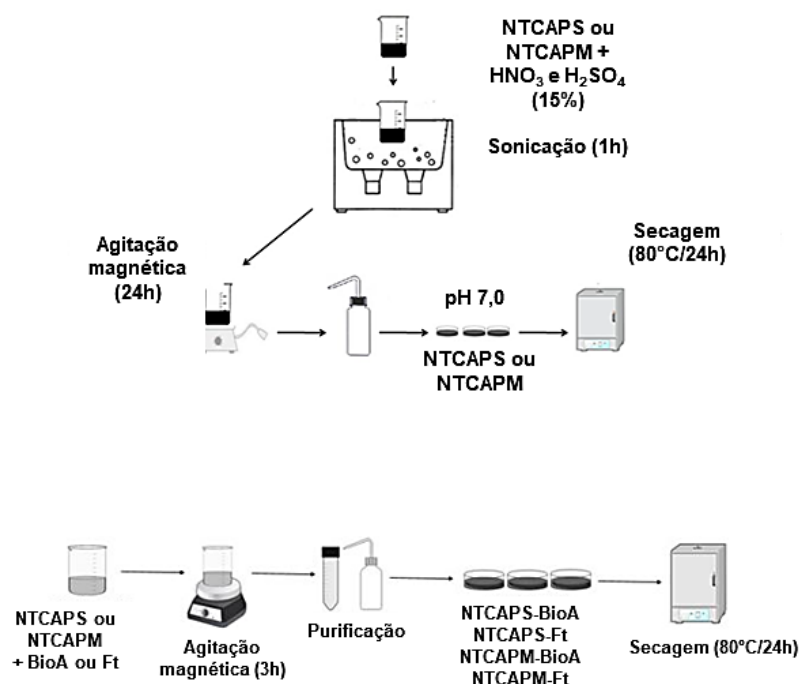


Figura 3. Funcionalização de NTCPS e NTCPM com isoflavonas.

Dispersibilidade: As dispersões foram preparadas misturando amostras (10 mg) em 3 mL de hidrogenoftalato de potássio (pH 4,0) e tampões fosfato (pH 7,0). As dispersões foram sonificadas por 15 min (YU *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2018).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV): As amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro usando um dispositivo de revestimento por pulverização BALTEC-SCD-005. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) e caracterização elemental foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-IT200 (mod 6360-LV) acoplado a um detector para espectroscopia dispersiva de energia (EDS) sob condições de alto vácuo com uma tensão de aceleração de 30 kV. Para medidas de EDS, as amostras não foram submetidas à etapa de metalização.

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier: Espectros FTIR de BioA, Ft, NTCAPS e NTCAPM antes e depois da funcionalização foram registrados após a preparação de pellets de KBr. A análise foi realizada na faixa de varredura de 4000–400 cm⁻¹ no espectrômetro PerkinElmer Spectrum™ 3 FT-IR (Waltham, MA, EUA).

Análise termogravimétrica (TGA): A TGA foi realizada nas amostras Ft, BioA, NTCAPS e NTCAPM, antes e após a funcionalização com isoflavonas, de 25 a 800°C, sob atmosfera de ar sintético (150 mL.min⁻¹) a 15°C/ min (HITACHI, mod STA7200RV), usando panela de cerâmica.

Ancoramento de fármaco: A porcentagem de isoflavona ancorada em NTCPM foi determinada usando amostras de NTCAPM-BioA e NTCAPM-Ft em triplicata. Os experimentos ocorreram de acordo com a metodologia descrita por Silva *et al.* (2015), com algumas modificações. As amostras (10 mg) foram embebidas em 20 mL de acetona, submetidas à sonicação por 20 minutos (banho de ultrassom) e depois filtradas (membrana PTFE 22 µm). Após filtração, as amostras foram secas e ressuspensas em 1,5 mL de metanol grau HPLC. As amostras foram analisadas usando um CLAE (instrumento Agilent 1260II HPLC), acoplado a um detector de matriz de diodos G7117C (1260 DAD HS), um sistema de entrega de solvente binário G7116A (1260 MCT) e um amostrador automático 27129C (1260 amostras de frascos). O método cromatográfico foi realizado em coluna Phenomenex - Kinetex EVO C18 100A 5 m (150 x 4,6 mm). A fase móvel consistia em água (A) (0,1% de ácido fórmico) e metanol (B) (0,1% de ácido fórmico) em condição de gradiente como se segue: 60→25% de B em 9 min; 25→1% de B até 42 min. A cromatografia foi realizada com fluxo de 1 mL.min⁻¹ a 35° C com volume de injeção de 20 µL. Os cromatogramas foram monitorados entre 260 e 280 nm e a concentração de cada isoflavona quantificada de acordo com a absorção máxima do respectivo composto.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras NTCPS e NTCPM apresentam tendência à autoagregação em solução aquosa antes do processo de oxidação com ácidos (Figura 4). Esse comportamento ocorre devido à atração dos NTC entre si pelas forças de Van der Waals. A dispersibilidade do NTCPM aumentou após o tratamento ácido (NTCAPM) em ambos os pH estudados, sendo mais proeminente em pH 7,0, forçada pelos grupos hidroxilas, que estabelecem uma interação polar-polar, gerando repulsões eletrostáticas (LEE *et al.*, 2007).

A funcionalização do NTCAPM utilizando isoflavonas melhorou a dispersibilidade do nanomaterial modificado, apontando para a ancoragem dessas moléculas no NTCAPM (Figura 4). A dispersão de nanotubos geralmente ocorre por repulsão eletrostática dos grupos carregados das isoflavonas e por impedimento estérico. A funcionalização do NTCAPM-Ft foi descrita por Vasconcelos *et al.* (2020). Segundo os autores, o átomo de H é despreendido espontaneamente dos grupos hidroxila fenólicos, gerando um radical livre na formononetina e dois na biochanina A. Este evento leva a uma taxa de reação mais rápida, onde 7-OH de Ft é mais lento que 5-OH de BioA (ZHANG *et al.*, 2010). Essas diferenças entre as isoflavonas levam a resultados diferentes de dispersibilidade. Além disso, Ft e BioA possuem um grupo metoxi que é responsável por um aumento das interações hidrofóbicas com o anel B da isoflavona e o NTCAPM. No entanto, BioA tem um grupo hidroxila adicional em C5 no anel A

em comparação com Ft, levando a uma diminuição nas interações hidrofóbicas ao redor do anel A das isoflavonas (ZAKŁOS-SZYDA *et al.*, 2020).

Independentemente do valor do pH do meio, os NTCPS permaneceram agregados em solução aquosa, mesmo após a funcionalização com as isoflavonas. No entanto, a densidade parece ter mudado, pois foi observado as partículas flutuando, sugerindo uma modificação na estrutura química. A funcionalização química da parede lateral dos NTC interrompe o sistema de ligação π , quebrando a simetria dos NTC pela introdução de átomos de carbono sp^3 saturados. Além disso, devido às suas múltiplas camadas de grafeno e defeitos na estrutura entreparedes, a maior quantidade de defeitos estruturais dos NTCPM favorece o processo de oxidação (SHI *et al.*, 2012). Isso explica a menor dispersibilidade e maior citotoxicidade dos NTCPS.

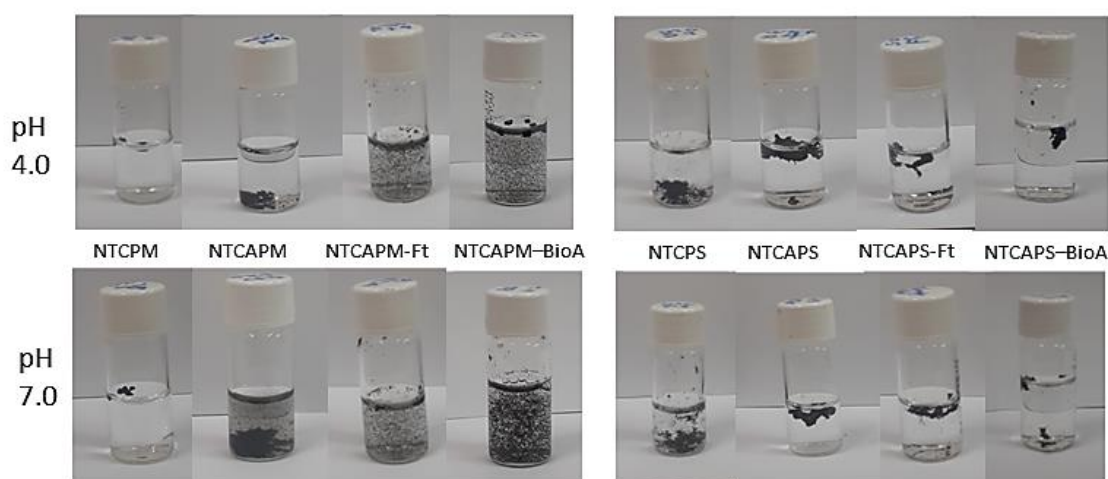


Figura 4. Fotografias digitais dos nanotubos (NTC) de paredes múltiplas e simples antes e após o processo de oxidação-funcionalização dispersos em solução aquosa no pH 4,0 e 7,0. Legendas: NTCPM, NTC de paredes múltiplas; NTCAPM, NTCPM oxidados com ácido; NTCAPM-Ft, NTCAPM funcionalizados com formononetina; NTCAPM-BioA, NTCAPM funcionalizado com biochanina A; NTCPS, NTC de parede simples; NTCAPS, NTCPS oxidados com ácido; NTCAPS-Ft, NTCAPS funcionalizado com formononetina; NTCAPS-BioA, NTCAPS funcionalizado com biochanina A.

As fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de NTCAPS e NTCAPM, antes e após a funcionalização usando isoflavonas, são apresentadas na Figura 5.

Os NTCAPS se apresentam como fitas longas e curvas (Figura 5, superior esquerdo), enquanto os NTCAPM se organizam em tiras densamente emaranhadas (Figura 5, superior direito). Após o tratamento ácido, o comprimento dos NTCAPM diminuiu, provavelmente devido aos grupos funcionais hidroxila introduzidos nas paredes dos NTCAPM. As amostras funcionalizadas com Ft (Figura 5, inferior) apresentaram estrutura semelhante às amostras originais. As imagens de NTCAPS-BioA e NTCAPM-BioA (Figura 5 - 2ª linha) mostram um

material irregular no qual a morfologia original dos NTCAPS desapareceu (NIKOLIC *et al.*, 2018).

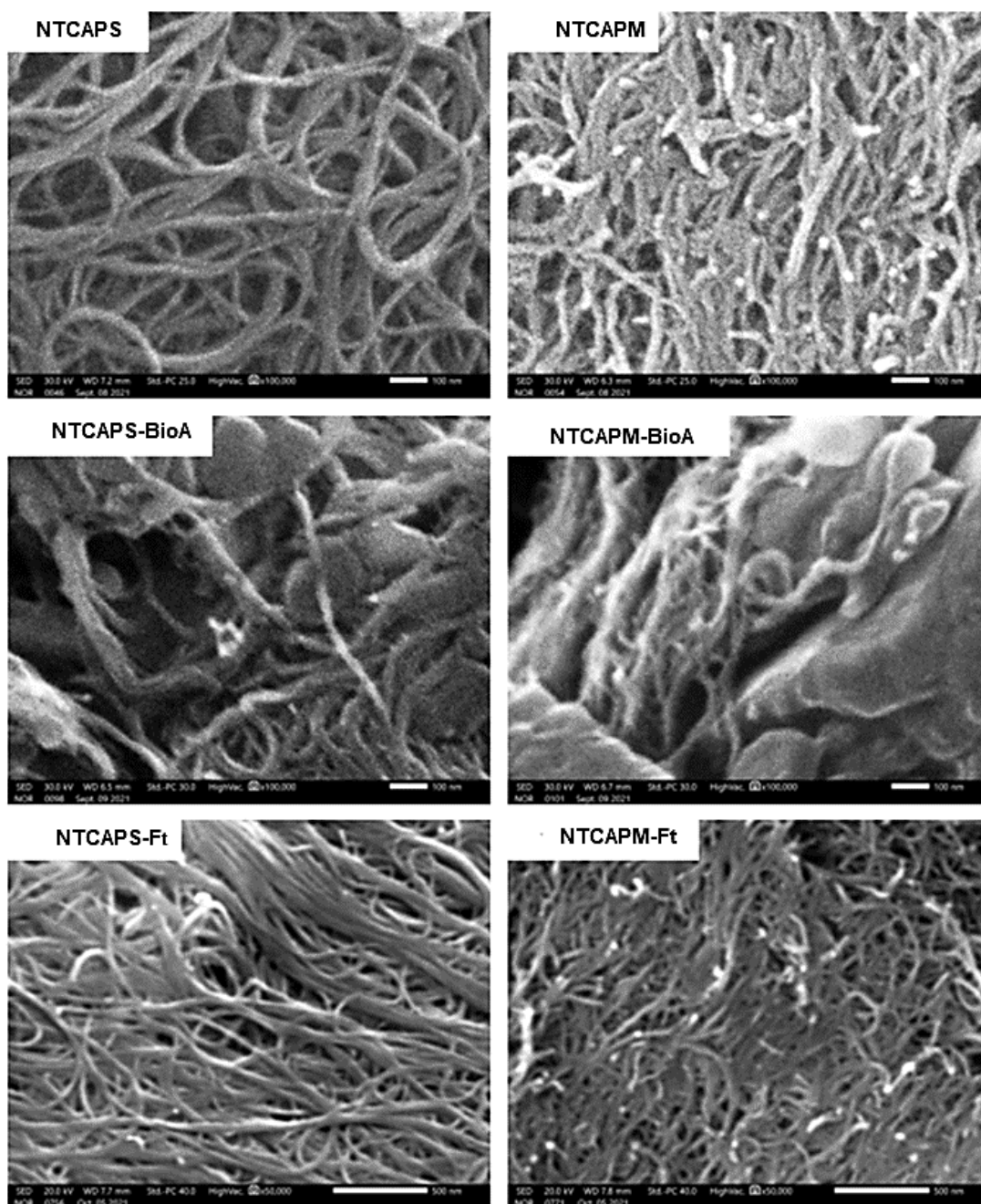


Figura 5. Imagens de MEV de NTCAPS, NTCAPS-Ft e NTCAPS-BioA na coluna da esquerda; NTCAPM, NTCAPM-Ft e NTCAPM-BioA na coluna da direita. Legendas: NTCPM, NTC de paredes múltiplas originais; NTCAPM, NTCPM tratados com ácido; NTCAPM-Ft, NTCAPM funcionalizado com formononetina; NTCAPM-BioA, NTCAPM funcionalizado com biochanina A; NTCPS, NTC de parede simples originais; NTCAPS, NTCPS tratados com ácido; NTCAPS-Ft, NTCAPS funcionalizado com formononetina; NTCAPS-BioA, NTCAPS funcionalizado com biochanina A.

A análise em EDS (Figura 6) mostra que o teor de oxigênio entre as amostras foi consistentemente diferente quando comparado às amostras antes da funcionalização com

isoflavonas. Foi observado um aumento significativo de oxigênio de $10,71 \pm 0,52\%$ em peso (NTCAPS) para $23,83 \pm 0,58\%$ em peso para NTCAPS-BioA e $19,59 \pm 1,02\%$ em peso para NTCAPS-Ft ($p < 0,001$). O mesmo comportamento foi observado para amostras de NTCAPM. O teor de oxigênio mudou de $17,06 \pm 0,22\%$ em peso para $30,33 \pm 2,74\%$ em peso para NTCAPM-BioA e $25,61 \pm 0,55$ para NTCAPM-Ft % em peso ($p < 0,001$). Houve diferença significativa também entre as amostras NTCAPS e NTCAPM, incluindo as duas funcionalizadas ($p < 0,001$). A isoflavona utilizada na funcionalização também promoveu diferença no teor de oxigênio. Esses resultados estão de acordo com os resultados de dispersibilidade, sugerindo que as amostras de NTCAPM apresentaram maior oxidação e consequentemente maior ancoragem de isoflavonas. O nível mais alto de oxigênio nas amostras de BioA é explicado pela hidroxila adicional da molécula.

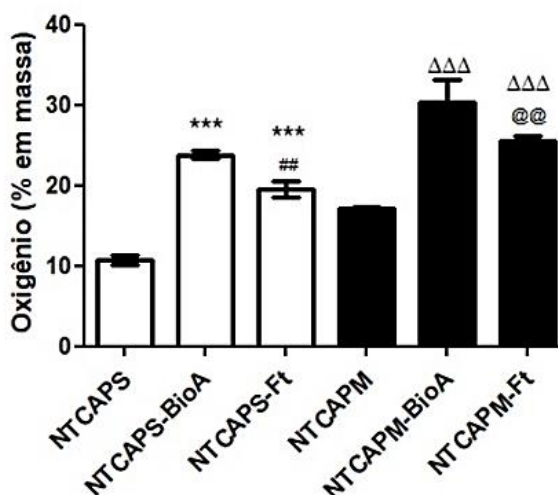


Figura 6. Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) dos nanotubos de carbono. Legenda: BioA: Biochanina A; Ft: Formononetina; NTCAPS: nanotubo de carbono de parede simples após oxidação; NTCAPS-BioA e NTCAPS-Ft: NTCAPS funcionalizado com BioA ou Ft respectivamente; NTCAPM: nanotubo de carbono de parede múltipla após oxidação; NTCAPM-BioA e NTCAPM-Ft: NTCAPM funcionalizado com Bio-A ou Ft respectivamente. ANOVA seguidos de Tukey, comparação realizada entre amostras com o mesmo tipo de NTCA. * amostras NTCAPS-Ft e NTCAPS-BioA são significativamente diferentes de NTCAPS para $p < 0,0001$; ## NTCAPS-Ft é significativamente diferente de NTCAPS_BioA para $p < 0,01$; ΔΔΔ NTCAPM-BioA e NTCAPM-Ft são significativamente diferentes de NTCAPM para $p < 0,001$; @@ NTCAPM-Ft é significativamente diferente de NTCAPM-BioA para $p < 0,01$.

Os espectros de FTIR das amostras NTCAPS (Figura 7A) e NTCAPM (Figura 7B) antes e após a funcionalização usando isoflavonas, bem como os espectros das moléculas de BioA e Ft podem ser observados na Figura 7. Os espectros NTCAPS e NTCAPS-BioA apresentam bandas discretas na região entre 3550 e 3400 cm^{-1} (Figura 7A1). No espectro NTCAPS-Ft é possível observar uma banda em torno de 3414 cm^{-1} , a qual também aparece no espectro Ft. Os espectros NTCAPS-BioA e BioA também apresentaram bandas em 3476

cm^{-1} (setas Figura 7A1). Essa região, além da banda em torno de 1620 cm^{-1} , é atribuída ao estiramento -OH e C=O dos grupos hidrofílicos carboxila (-COOH) ligados aos NTCPM.

Ambas as amostras modificadas (NTCAPS-BioA e NTCAPS-Ft) apresentaram bandas entre 1.500 e 1.000 cm^{-1} , ausentes nos espectros NTCAPS (Figuras 7A2 e 7A3) e compatíveis com as bandas apresentadas nos espectros BioA e Ft. O tratamento ácido de NTCPM (NTCAPM) promoveu a inserção de grupos funcionais contendo oxigênio. Esses grupos hidrofílicos, localizados nas superfícies externa e interna dos NTCPM, são sítios de adsorção ou fixação de diferentes moléculas (YAVARI; ASADOLLAHI; ABBAS MOHSEN, 2017). Para amostras de NTCAPM, estas apresentaram perfil semelhante na região de 3.550 - 3.450 cm^{-1} , exceto a discreta banda em 3.416 cm^{-1} no NTCAPM-Ft (setas Figuras 7B1) apresentado também no espectro de Ft. Essa região, além de bandas em torno de 1700 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} , é atribuída ao alongamento -OH e carbonila do grupo carboxílico. Além disso, as bandas em 2.910 cm^{-1} nos espectros do NTCAPM-Ft podem ser atribuídas às vibrações de estiramento de CH dos grupos funcionais metil de Ft, sugerindo que o fármaco foi ancorado com sucesso no NTCAPM (SOLIMAN; MARWANI; ALBISHRI, 2013). As bandas em 2931 e 2856 cm^{-1} observadas em ambos os espectros de NTCAPM-BioA, NTCAPM-Ft são características de vibrações de estiramento assimétrico e simétrico de vas (CH_2) e vs (CH_2). Esses resultados sugerem que a funcionalização ocorreu para o NTCAPM (YAVARI; ASADOLLAHI; ABBAS MOHSEN, 2017). O espectro NTCAPM-Ft também apresenta sinais entre 1500 e 1000 cm^{-1} , o que pode ser atribuído à vibração do esqueleto do composto aromático pertencente ao grupo das isoflavonas. As bandas de absorção representadas entre 1625 e 1516 cm^{-1} são originadas da vibração de valência C=C no anel aromático (NIKOLIC et al., 2018), que está ausente nos espectros NTCAPM e NTCAPM-BioA, mas compatível com a mesma região no espectro Ft (Figura 7B3).

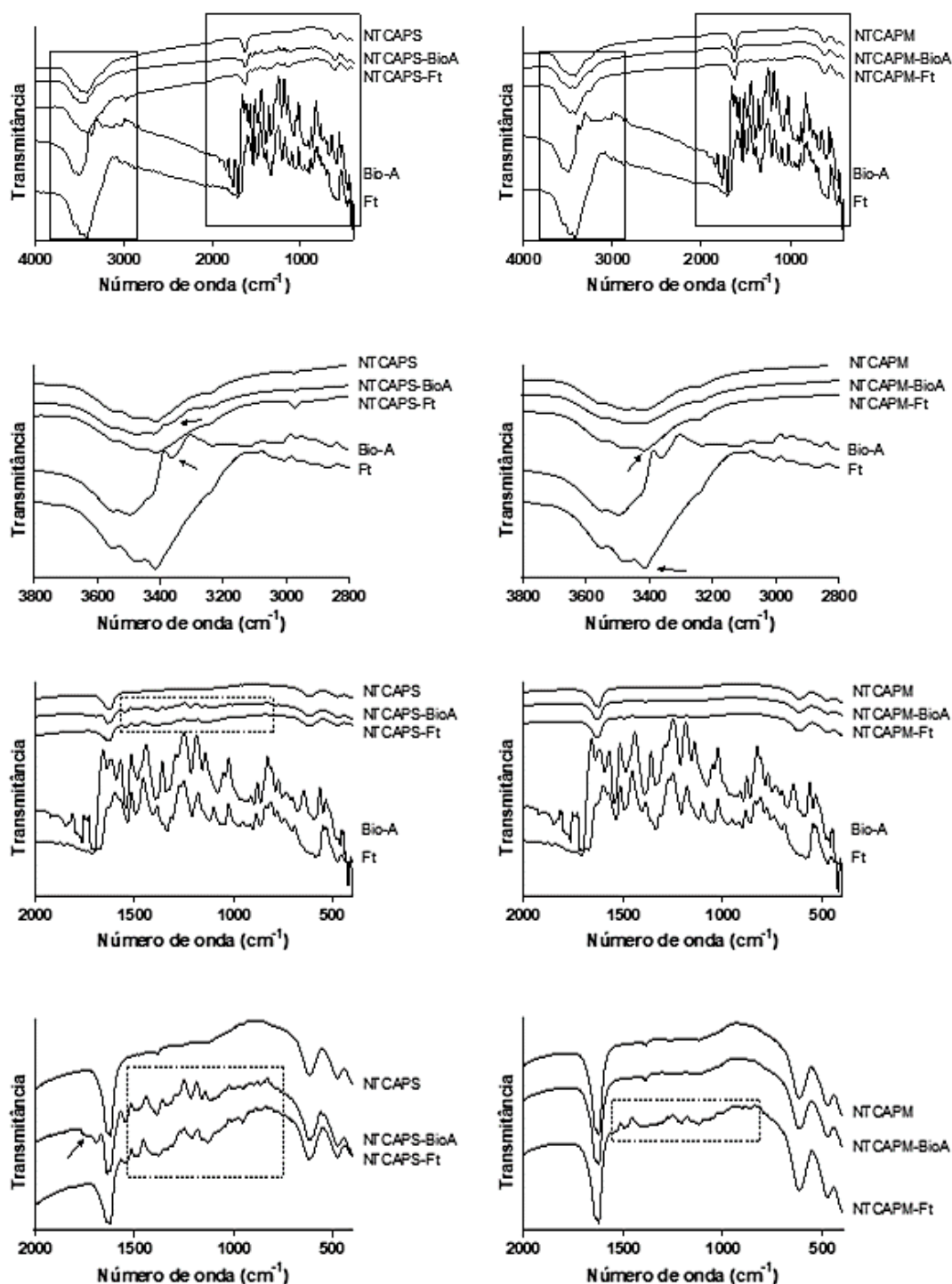


Figura 7. Espectros FTIR de nanotubo de carbono de parede simples (lado esquerdo) e parede múltipla (lado direito), com suas respectivas ampliações. Legenda: BioA: Biochanina A; Ft: Formononetina; NTCAPS: nanotubo de carbono de parede simples após oxidação; NTCAPS-BioA e NTCAPS-Ft: NTCAPS funcionalizado com BioA ou Ft respectivamente; NTCAPM: nanotubo de carbono de parede múltipla após oxidação; NTCAPM-BioA e NTCAPM-Ft: NTCAPM funcionalizado com Bio-A ou Ft respectivamente.

Uma característica importante que deve ser levada em consideração é a estabilidade térmica dos nanotubos de carbono. A análise termogravimétrica (TGA) é um meio útil para observar a integridade dos tubos, avaliando a temperatura de degradação e estudando o perfil

térmico dos nanomateriais (MORAIS *et al.*, 2020). As curvas TGA de isoflavonas e nanotubos antes e após a funcionalização estão apresentadas na Figura 8 e os parâmetros térmicos obtidos a partir das curvas TGA/DTG estão descritos na tabela 1. Todas as amostras, exceto NTCAPS-BioA, apresentaram baixo teor de água, observado na primeira etapa de perda de massa (até 150°C). O NTCAPS demonstrou maior estabilidade térmica quando comparado ao NTCAPM, pois o primeiro perdeu apenas 24,3% de massa até 800°C, enquanto o NTCAPM perdeu mais de 90%. As amostras de NTCAPS após funcionalização apresentaram estabilidade térmica diferente entre as isoflavonas estudadas. NTCAPS-BioA foram totalmente carbonizados até 315°C, apontando que, sob aquecimento, ocorreu a destruição da conformação do nanotubo quando funcionalizado com BioA. O NTCAPS-Ft apresentou maior estabilidade térmica, degradando em duas etapas (T_{max} em 381,1°C perdendo cerca de 73% de massa, com total degradação em torno de 665°C). As amostras de NTCAPM perderam 2,89% até 150°C, valor este relacionado à massa de água provavelmente ligada a grupos carboxílicos introduzidos após tratamento ácido. A introdução da biochanina A no NTCAPM diminuiu a quantidade de água ligada (1,75%) mostrando o caráter hidrofóbico da superfície após reação com esta molécula que possui baixa solubilidade em água (VASCONCELOS *et al.*, 2020).

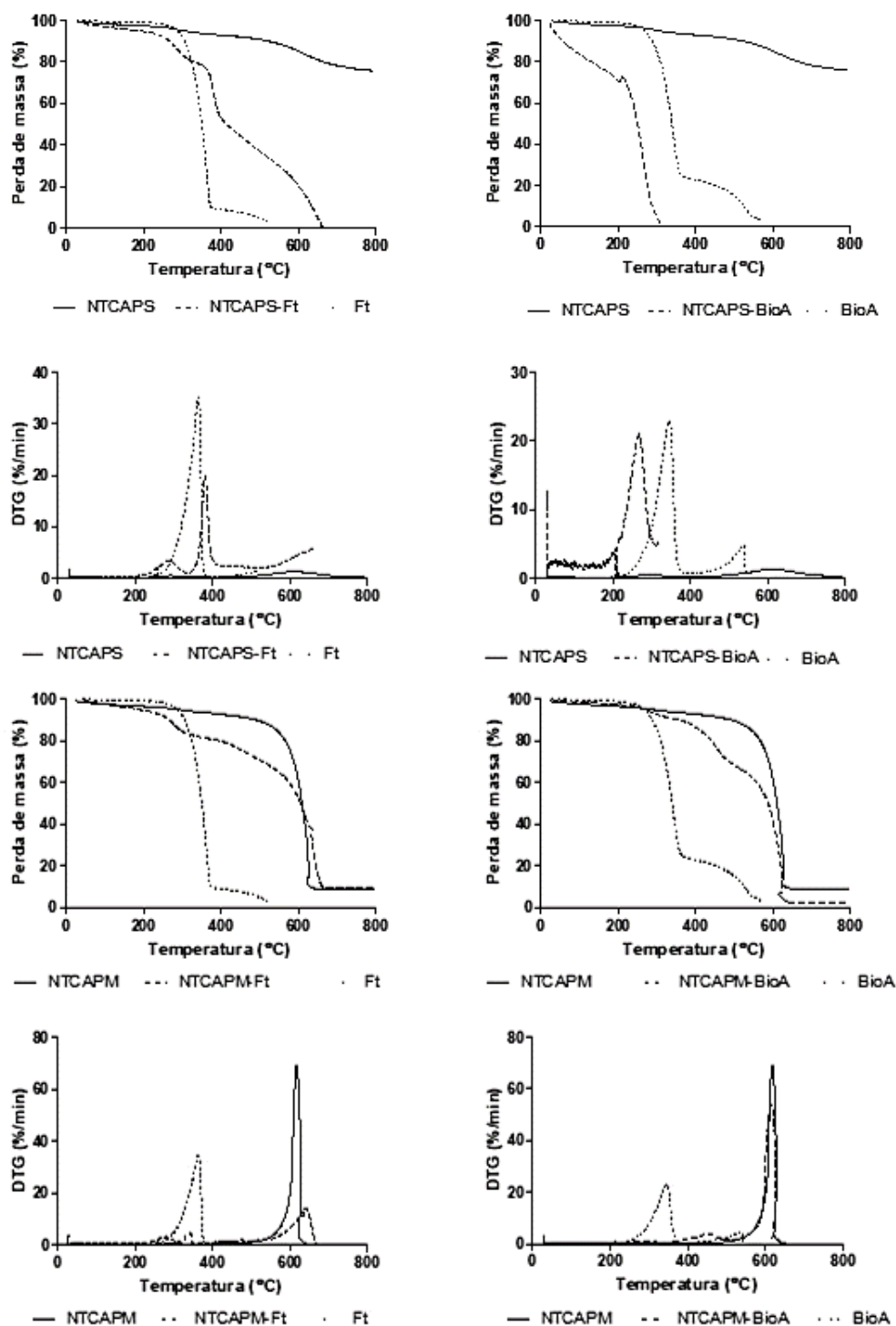


Figura 8. Curvas termogravimétricas (1ª e 3ª linhas) e derivadas (2ª e 4ª linhas) de NTCAPS, NTCAPS-Ft e Ft (na coluna da esquerda - 1ª e 2ª linhas), NTCAPS, NTCAPS-BioA e BioA (na coluna direita - 1ª e 2ª linhas); NTCAPM, NTCAPM-Ft e Ft (na coluna da esquerda - 3ª e 4ª linhas); NTCAPM, NTCAPM-BioA e BioA (na coluna da direita - 3ª e 4ª linhas). Abreviaturas: NTCAPS: nanotubo de carbono de parede simples após oxidação; NTCAPS-BioA: NTCAPS após funcionalização com Biochanina A; NTCAPS-Ft: NTCAPS após funcionalização com Formononetina; NTCAPM: nanotubo de carbono de paredes múltiplas após oxidação; NTCAPM-BioA: NTCAPM após funcionalização com Biochanina A; NTCAPM-Ft: NTCAPM após funcionalização com Formononetina; Ft: formononetina; BioA: biochanina A.

Tabela 1. Parâmetros térmicos obtidos das curvas TGA/DTG. Legendas: NTCAPM (nanotubos de carbono de parede múltipla após tratamento com ácido), NTCAPM-BioA (NTCAPM funcionalizado com BioA), NTCAPM-Ft (NTCAPM funcionalizado com Ft), NTCAPS (nanotubos de carbono de parede simples após tratamento com ácido), NTCAPS-BioA (NTCAPS funcionalizado com BioA), NTCAPS-Ft (NTCAPS funcionalizado com Ft), BioA (biochanina A), Ft (formononetina).

Amostra	Perda de peso (%)				T _{máx} (°C) (DTGA)
	0-150°C	150-500°C	500 - 800°C	Total até 800°C	
NTCAPM	2,9	7,5	80,6	91,0	618,1
NTCAPM-BioA	1,8	30,0	66,3	98,1	615,0
NTCAPM- Ft	3,7	25,5	61,7	90,8	635,0
NTCAPS	2,2	7,0	15,1	24,3	612,2
NTCAPS-BioA	22,2	77,3 (315°C)	-	100,0	266,9
NTCAPS- Ft	4,1	58,9	37,0	100,0	381,1
Bio-A	0,7	84,1	15,2	100,0	344,5
Ft	0,7	94,3	5,0	100,0	364,0

As amostras de NTCAPM, antes da funcionalização, apresentaram temperatura máxima de degradação em 618,1°C. Após funcionalização, NTCAPM-BioA e NTCAPM-Ft apresentaram perda de massa de 30,0% e 25,5% entre 150 e 500°C, diferente do NTCAPM original, que apresentou apenas 7,6% de perda de massa nessa faixa de temperatura. Isso pode ser explicado pelo fato de que, nesta região de temperatura, as isoflavonas são degradadas e na amostra de NTCAPM os oxigênios introduzidos na molécula após a oxidação (grupos carboxílico, fenol e cetona) foram decompostos (YAVARI; ASADOLLAHI; ABBAS MOHSEN, 2017). De acordo com Dowling *et al.* (2010), a BioA apresenta uma perda de carbono entre 170 e 340°C. No presente trabalho, a temperatura máxima de degradação desta molécula foi de 344,5°C, sugerindo a presença de impurezas. Resultados semelhantes foram observados por Vasconcelos *et al.* (2020) que estudou a funcionalização de NTCAPM utilizando Ft.

Acima de 500°C, a perda de massa está relacionada à decomposição do NTCAPM. Os nanomateriais apresentaram uma intensa queda de perda de massa, indicando total desestabilização do esqueleto do nanotubo com temperatura máxima de decomposição em 618,1, 615,0 e 635°C para NTCAPM, NTCAPM-BioA e NTCAPM-Ft respectivamente. No entanto, a funcionalização utilizando BioA apresentou maior % de perda de massa total (98,1%) quando comparada a NTCAPM (91,0%) e NTCAPM-Ft (90,8%), apontando para o maior desarranjo da estrutura do nanotubo de carbono. Os perfis das curvas termogravimétricas sugerem que as amostras após a funcionalização são diferentes daquela original em termos de suas propriedades térmicas.

Após confirmar que o NTCAPM apresenta um melhor desempenho para ancoramento das isoflavonas, a ancoragem dos fármacos (Ft e BioA) em amostras de NTCAPM foram estudados. O perfil cromatográfico das amostras, bem como a quantificação das isoflavonas

ancoradas no nanotubo de parede múltipla estão apresentados na Figura 9 e Tabela 2 respectivamente.

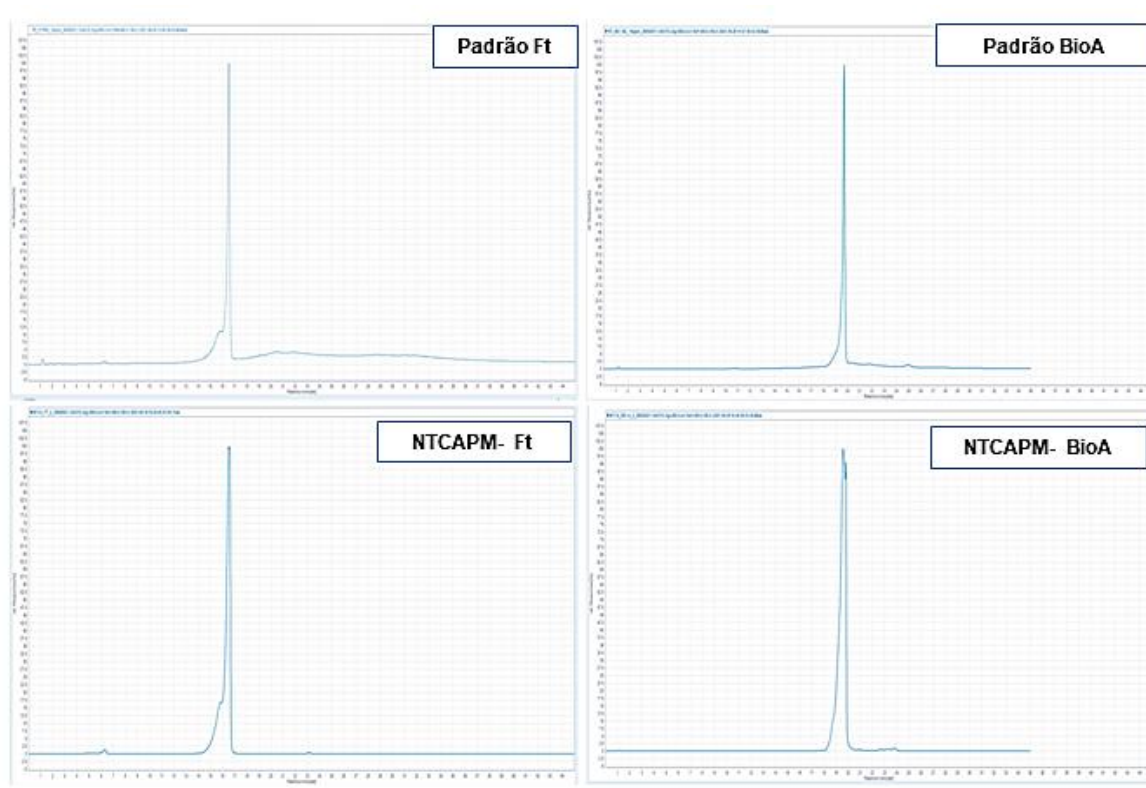


Figura 9. Perfil cromatográfico das amostras. Legendas: Ft, formononetina; BioA, biochanina A; NTCAPM-Ft, nanotubo de carbono de paredes múltiplas após oxidação com formononetina; NTCAPM-BioA, nanotubo de carbono de paredes múltiplas após oxidação usando Biochanina A.

No processo de funcionalização com as isoflavonas, utilizou-se a proporção 1:1 (m/m) de NTCAPM e isoflavona para ambas as moléculas. Os resultados de quantificação das isoflavonas ancoradas no NTCAPM mostraram que Bio A apresentou uma maior porcentagem de ancoragem quando comparada a Ft (Tabela 2). Esses resultados corroboram aos dados da análise térmica, onde a porcentagem de perda de massa entre 150 e 500°C foi de 30,0 e 25,5% para BioA e Ft, respectivamente (Tabela 1). Esses resultados indicam que o processo pode ser melhorado, utilizando menor quantidade de isoflavonas, já que no máximo 31% do fármaco reage com o NTCAPM.

Tabela 2. Eficiência de drogas ancoradas em NTCAPM após processo de funcionalização.

Amostra	% fármaco ancorado
NTCAPM-BioA	30,9±0,6 de BioA
NTCAPM-Ft	23,1±0,1 Ft

4 CONCLUSÕES

Ambos os tipos de nanotubos podem ser funcionalizados usando isoflavonas. No entanto, os nanotubos de parede simples apresentaram baixa estabilidade térmica após a funcionalização e mantiveram-se aglomerados em solução aquosa. Esse desempenho os torna menos viável para aplicações biomédicas. A utilização de NTCAPM se mostrou viável, com melhor dispersibilidade em solução aquosa e possibilidade de carreamento das duas isoflavonas testadas.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, R.A.; NUNES, T.L.; NUNES, T.L.; PAIXÃO, A.O.; BELO NETO, R. S.; MOURA, ALBUQUERQUE JUNIOR, R.L.C.; CÂNDIDO, E.A.; PADILHA, F.F.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; GOMES, M.Z.; CARDOSO, J.C. Hydroalcoholic extract of red propolis promotes functional recovery and axon repair after sciatic nerve injury in rats. *Pharmaceutical biology*, 2016; 54(6): 993-1004.
- BARREJÓN, M.; MARCHESAN, S.; ALEGRET, N.; PRATO, M. Carbon nanotubes for cardiac tissue regeneration: state of the art and perspectives. *Carbon*, 2021; 184: 641-650.
- BEZERRA, G.B.; SOUZA, L.M.; SANTOS, A.S.; ALMEIDA, G.K.; SOUZA, M.T.; SANTOS, S.L.; CAMARGO, E.A.; LIMA, B.S.; ARAÚJO, A.A.S.; CARDOSO, J.C.; GOMES, S.V.; GOMES, M.Z.; ALBUQUERQUE, R.L.J. Hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis exerts protective effects on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rodent model. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2017; 85: 687-696.
- CAVENDISH, R.L.; SANTOS, J.S.; BELO NETO, R.; PAIXÃO, A.O.; OLIVEIRA, J.V.; ARAUJO, E.D.; BERRETTA, E.S.A.A.; THOMAZZI, S.M.; CARDOSO, J.C.; GOMES, M.Z. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *Journal of ethnopharmacology*, 2015; 173: 127-33.
- CHEDRAUI, P.; SAN MIGUEL, G. L.; MOROCHO, H.N.; ROSS, S. Effect of Trifolium pratense-derived isoflavones on the lipid profile of postmenopausal women with increased body mass index. *Gynecol endocrinol* 2008; 24(11): 620-4.
- CIRILLO, G.; HAMPEL, S.; KLINGELER, R.; PUOCI, F.; IEMMA, F.; CURCIO, M.; PARISI, O.I.; SPIZZIRRI, U.G.; PICCI, N.; LEONHARDT, A.; RITSCHER, M.; BÜCHNER, B. Antioxidant multi-walled carbon nanotubes by free radical grafting of gallic acid: New materials for biomedical applications: Antioxidant CNT by free radical grafting. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2011; 63(2): 179-88.
- DOWLING, S.; REGAN, F.; HUGHES, H. The characterization of the properties and antioxidants of isoflavone metal chelates. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2010; 104(10): 1091-8.
- GUO, B.; LIAO, C.; LIU, X.; YI, J. Preliminary study on conjugation of formononetin with multiwalled carbon nanotubes for inducing apoptosis via ROS production in HeLa cells. *Drug Des Devel Ther*, 2018; 12: 2815 -2826.

HARINI, R.; EZHUMALAI, M.; PUGALENDI, K.V. Antihyperglycemic effect of biochanin A, a soy isoflavone, in streptozotocin diabetic rats. *European journal of pharmacology*, 2012; 676(1-3): 89-94.

HSU, Y.N.; SHYU, H.W.; HU, T.W.; YEH, J.P.; LIN, Y.W.; LEE, L.Y.; YEH, Y.T.; DAI, H.Y.; PERNG, D.S.; SU, S.H.; HUANG, Y.H.; SU, S.J. Antiproliferative activity of biochanin A in human osteosarcoma cells via apoptosis involved in mitochondria. *Food and Chemical toxicology*, 2018; 112: 194-204.

KITTANA, N.; ASSALI, M.; ABU-RASS, H.; LUTZ, S.; HINDAWI, R.; GHANNAM, L.; ZAKARNEH, M.; MOUSA, A. Aprimoramento da cicatrização de feridas por carbono de parede única/múltipla nanotubos complexados com quitosana. *Int J Nanomedicine*, 2018; 13, 7195-7206.

KOLE, L.; GIRI, B.; MANNA, S.K.; PAL, B.; GHOSH, S. Biochanin-A, an isoflavon, has experienced antiproliferative and anti-inflammatory activities through expression of iNOS, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blockade of NFκB nuclear translocation. *Revista Europeia de Farmacologia*, 2011; 653(1-3): 8-15.

LEE, J.; KIM, M.; HONG, C.K.; SHIM, S.E. Measurement of dispersion stability of pristine and surface-modified multi-walled carbon nanotubes in various polar and non-polar solvents. *Medição de Ciência e Tecnologia*, 2007.; 18(12): 3707 -3712.

LI, T.; ZHAO, X.; MO, Z.; HUANG, W.; YAN, H.; LING, Z.; YE, Y. Formononetin promotes cell cycle arrest by downregulating Akt/Cyclin D1/CDK4 in human prostate cancer cells: *revista internacional de fisiologia celular experimental, bioquímica e farmacologia*, 2014; 34(4): 1351-1358.

MALCA-GARCIA, G.R.; ZAGAL, D.; GRAHAM, J.; NIKOLIĆ, D.; FRIESEN, J.B.; LANKIN, D.C.; CHEN, S.N.; PAULI, G.F. Dynamics of the isoflavone metabolome of traditional *Trifolium pratense* L preparations. *Journal of ethnopharmacology*, 2019; 238: 111865-111865.

MORAIS, R.P.; NOVAIS, G.B.; SANGENITO, L.S.; SANTOS, A.L.S.; PRIEFER, R.; MORSINK, M.; MENDONÇA, M.C.; SOUTO, E.B.; SEVERINO, P.; CARDOSO, J.C. Naringenin-Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes: A Potential Approach for Site - Distribution remotely controlled anticancer drug for the treatment of lung cancer cells, *Int J Mol Sci*, 2020; 21(12): 45-57.

NETO, C.M.S.; LIMA, F.C.; MORAIS, R.P.; ANDRADE, L.R.M.; CHAUD, M. V.; PEREIRA, M.M.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R.L.C.; CARDOSO, J.C.; ZIELINSKA, A.; SOUTO, E.B.; LIMA, A.S.; SEVERINO, P. Rutin -Functionalized multi-walled carbon nanotubes: molecular docking, physical chemistry and cytotoxicity in fibroblasts. *Tóxicos*, 2021; 9(8).

NIKOLIC, I.L.; SAVIC, I.M.; POPSAVIN, M.M.; RAKIC, S.J.; MIHAJLOV-KRSTEV, T.M.; RISTIC, I.S.; ERIC, S.P.; SAVIĆ-GAJIC, I.M. Preparation, characterization and antimicrobial activity of the inclusion complex of biochanin A with (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin. *O Jornal de farmácia e farmacologia*, 2018; 70(11): 1485-1493.

NOVAIS, G.B.; SANTOS, S.R.; SANTANA, J.R.; PEREIRA FILHO, R.; CUNHA, J.L.S.; LIMA, B.S.; ARAÚJO, A.A.; SEVERINO, P.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R.L.C.; CARDOSO, J.C.; SOUTO, E.B.; GOMES, M.Z. Development of a New Formulation Based on In Situ Light-Cured Polymer for the Treatment of Spinal Cord Injury. *Polímeros*, 2021; 13(24):42-47.

PANCHE, A.N.; DIWAN, A.D.; CHANDRA, S.R. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*, 2016; 5: e47-e47.

PEÑA, B.; BOSI, S.; AGUADO, B.A.; BORIN, D.; FARNSWORTH, N.L.; DOBRINSKIKH, E.; ROWLAND, T.J.; MARTINELLI, V.; JEONG, M.; TAYLOR, M.R.G.; LONG, C.S.; SHANDAS, R.; SBAIZERO, O.; PRATO, M.; ANSETH, K.S.; PARK, D.; MESTRONI, L. Reverse thermal gel functionalized by injectable carbon nanotubes promotes cardiomyocyte survival and survival, *ACS. Applied Materials & Interfaces*, 2017; 9(37): 31645-31656.

PHELANE, L.C.G.; BARSAN, M.M.; BAKER, P.G.L.; BRETT, C.M.A.; IWUOHA, E.I. Electrochemical determination of tyrosine using a novel tyrosinase multiwall carbon nanotube (MWCNT) polysulfone-modified glassy carbon (GCE) electrode. *Cartas Analíticas*, 2020; 53(2): 308-321.

POULADZADEH, F.; KATBAB, A.A.; HAGHIGHIPOUR, N.; KASHI, E. Electrospinning scaffolds loaded with thermoplastic urethane (TPU)-based carbon nanotubes with enhanced experience and neural differentiation of mouse mesenchymal stem cells: The role of electrical conductivity. *European Polymer Journal*, 2018; 105: 286-296.

PUNETHA, V.D.; RANA, S.; YOO, H.J.; CHAURASIA, A.; MCLESKEY, J.T.; RAMASAMY, N.G.; SAHOO; CHO, J.W. Functionalization of carbon nanomaterials for advanced polymeric nanocomposites: A comparative study between CNT and graphene. *Progress in Polymer Science*, 2017; 67: 1-47.

SALIEV, T. The Advances in Biomedical Applications of Carbon Nanotubes. *Journal of Carbon Research*, 2019; 5(2): 29.

SAMADISHADLOU, M.; FARSHBAF, M.; ANNABI, N.; KAVETSKYY, T.; KHALILOV, R.; SAGHFI, S.; AKBARZADEH, A.; MOUSAVI, S. Magnetic carbon nanotubes: preparation, physical properties and applications in biomedicine. *Artificial Células, Nanomedicina e Biotecnologia*, 2018; 46(7):1314-1330.

SHI, X.; JIANG, B.; WANG, J.; YANG, Y. Influence of wall number and surface functionalization of carbon nanotubes on their antioxidant behavior in high-density polyethylene. *Carbon*, 2012; 50(3): 1005-1013.

SHRESTHA, S.; SHRESTHA, B.K.; LEE, J.; JOONG, O.K.; KIM, B.S.; PARK, C.H.; KIM, C.S. C. A conductive neural interface of polyurethane/silk-functionalized multiwall carbon nanotubes with enhanced mechanical strength for neuroregeneration, materials science and engineering, *Materiais para aplicações biológicas*, 2019; 102: 511-523.

SILVA, R.O.; ANDRADE, V.M.; RÊGO, E.S.B.; DÓRIA, G.A.A.; LIMA, B.D.S.; SILVA, F.A.; ARAÚJO, A.A.S.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R.L.C.; CARDOSO, J.C.; GOMES, M.Z. Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 2015; 170: 66-71.

SOLIMAN, E.M.; MARWANI, H. M.; ALBISHRI, H. M. New solid phase extractor based on the functionalization of multi-walled carbon nanotubes with 5-aminosalicylic acid for pre-concentration of Pb(II) in water sample prior to ICP-OES experimente. *Monitoramento e Avaliação Ambiental*, 2013; 185(12): 10269-80.

SUDHA, N.; SAMEENA, Y.; ENOCH, I.V.M.V. β -Cyclodextrin encapsulates biochanin A and influences its binding to bovine serum albumin: change in binding strength. *Journal of Solution Chemistry*, 2016; 45(3): 431-444.

VASCONCELOS, A.C.P.; MORAIS, R.P.; NOVAIS, G.B.; S.B.S DA.; MENEZES, L.R.; SANTOS, O.S.; COSTA, L.P.; CORREA, C.B.; SEVERINO, P.; GOMES, M.Z.;

ALBUQUERQUE JÚNIOR, R.L.C.; CARDOSO, J.C. In situ photocrossable formulation of nanocomposites based on multi-walled carbon nanotubes and formononetin for potential application in the treatment of spinal cord injuries. *Nanomedicine: nanotecnologia, biologia e medicina*, 2020; 29: 102272.

XIANG, C.; ZHANG, Y.; GUO, W.; LIANG, X.-J. Biomimetic carbon nanotubes for therapy of neurological diseases as concomitant medication. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2020; (2): 239-248.

XU, Z.; LIANG, Z.; DING, F. Isomerization of carbon nanomaterials with sp² hybridization: structural transformation and topological defects of fullerene, carbon nanotube and graphene. 2017; 7(2): e1283.

YANG, Y.; ZHAO, Y.; AI, X.; CHENG, B.; LU, S. Formononetin suppresses prospects of human non-small cell lung cancer through induction of cell cycle arrest and apoptosis. *International Journal of Clinical and Experimental Patologia*, 2014; 7(12): 8453-8461.

YAVARI, R.; ASADOLLAHI, N.; MOHSEN, A. M. Preparation, characterization and evaluation of a hybrid material based on strong multiwall carbon nanotubes for the removal of thorium from aqueous solution. *Progress in Nuclear Energy*, 2017.; 100: 183-191.

YU, H.; ZHAO, H.; HUANG, C.; DU, Y. Mechanically and electrically enhanced CNT collagen hydrogels as electrical scaffolds for engineered cardiac constructs, *ACS. Biomaterials Science & Engineering*, 2017; 3(11): 3017-3021.

ZAKŁOS-SZYDA, M.; BUDRYN, G.; GRZELCZYK, J.; PÉREZ-SÁNCHEZ, H.; ŻYŻELEWICZ, D. Evaluation of Isoflavones as Bone Resorption Inhibitors through Interactions with the Nuclear Factor- κ B Ligand Activating Receptor (RANKL), 2020. 25(1): 206.

ZHANG, J.; DU, F.; PENG, B.; LU, R.; GAO, H.; ZHOU, Z. Structure, electronic properties and radical scavenging control of daidzein, genistein, formononetin and biochanin A: A functional density study. *Journal of Molecular Structure*, 2010.; 955(1-3): 1-6.

ZHOU, R.; XU, L.; YE, M.; LIAO, M.; DU, H.; CHEN, H. Formononetin inhibits migration and invasion of MDA-MB-231 and 4T1 breast cancer cells by the discharge of MMP-2 and MMP-9 through PI3K/AKT signaling pathways. *Hormonal and metabolic research*, 2014.; 46(11): 753-760.

ZHOU, Y.; FANG, Y.; RAMASAMY, R.P. Non-covalent functionality of carbon nanotubes for the development of electrochemical biosensors. *Sensores*, 2019; 19(2): 753-760.

CAPÍTULO 3

NANOFORMULAÇÕES DE HIDROGÉIS FOTOPOLIMERIZÁVEIS CONTENDO NTCAPM-EHPV PARA O TRATAMENTO DE LESÃO MEDULAR *IN SITU* EM MODELO MURINO

RESUMO

A lesão da medula espinal (LME), inibe a regeneração axonal das células acometidas pelo trauma. Essa limitação, promove perda da sensibilidade e da motricidade do indivíduo que sofreu injúria. Estratégias para reverter essa condição patológica pós-traumática são escassas, fazendo-se necessária a busca por novas alternativas de tratamento. Nanoformulações de nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCAPM) funcionalizadas com extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV), foram caracterizadas e avaliadas em modelo de LME. A caracterização ocorreu por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia (FTIR e Raman) e TGA. Após o tratamento dos NTC em meio ácido os NTCAPM apresentaram melhora na dispersibilidade dos NTC, sendo esta aprimorada após a funcionalização com o EHPV. Ocorreram mudanças nas estruturas dos NTCAPM antes e após a funcionalização, sugerindo a adição de grupos funcionais na parede lateral do NTCAPM. Os nanocompósitos foram então incorporados em hidrogéis de GelMA para a obtenção da formulação, que foi avaliada ainda quanto às condições de fotopolimerização e grau de intumescimento. A fotopolimerização de GelMA contendo NTCAPM foi possível a partir de 30 s. O índice de intumescimento do hidrogel contendo NTCAPM-EHPV foi reduzido em comparação com NTCAPM. Os NTCAPM foram submetidos à LME utilizando Ratas Wistar adultas. Após 7 dias do tratamento *in situ*, os ratos apresentaram melhora nos escores da avaliação funcional por meio do teste (BBB). Com base nos resultados obtidos, conclui-se que é possível a funcionalização do NTCAPM utilizando EHPV, onde foi possível observar melhora funcional significativa, principalmente do grupo contendo o NTCAPM-EHPV. A melhora na motricidade ocorreu pela atividade anti-inflamatória do EHPV.

Palavras chave: nanotubos de carbono de paredes múltiplas; funcionalização; anti-inflamatória.

1 INTRODUÇÃO

A lesão da medula espinal (LME) promove alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) devido ao próprio trauma e pelos eventos secundários que ocorrem após a injúria. Os principais acometimentos estão relacionados à destruição da barreira hematoencefálica, a exacerbação do processo inflamatório, à isquemia, ao estresse oxidativo, à degeneração axonal, à astrogliose, apoptose celular e necrose. Como consequência tem-se a perda ou limitação da atividade sensório-motora (SHENDE & SUBEDI *et al.*, 2017), reduzindo a qualidade de vida do indivíduo acometido pela injúria (ROUANET *et al.*, 2017).

O SNC é muito importante para o desenvolvimento das atividades sensoriais e motoras. No entanto, apresenta capacidade regenerativa limitada, levando a danos

irreversíveis após seu acometimento (STRUZYNA *et al.*, 2014). Essa incapacidade regenerativa do SNC está associada à insuficiência de células neurais e a impossibilidade de células maduras de se proliferar, migrar e regenerar pelo microambiente formado no local da lesão (MARK *et al.*, 2018). Essa limitação, ocorre principalmente, pelo processo inflamatório desencadeado após o trauma, que aumenta a reatividade dos astrócitos e forma a cicatriz glial na área de lesão inibindo a regeneração (VASCONCELOS *et al.*, 2020).

Os tratamentos utilizados na LME se limitam a mitigar os eventos iniciais do processo inflamatório, não atuando no favorecimento e estímulo para a proliferação celular e reconexão neural (MARCON *et al.*, 2016; HACHEM *et al.*, 2017). Estudos têm sido realizados apresentando novas estratégias que aumentem a capacidade regenerativa, criando um ambiente favorável para a proliferação celular e recuperação tecidual (NICHOL *et al.*, 2010; FAN *et al.*, 2018). Neste sentido, destaca-se o uso de biomateriais que são capazes de formar hidrogéis biocompatíveis. Estes materiais têm sido utilizados como estruturas biomiméticas de matriz extracelular tridimensional, criando um microambiente favorável para a proliferação celular. Os hidrogéis de gelatina metacrilada (GelMA) são aplicados em modelos de lesões de tecidos moles, regeneração óssea, regeneração de tecido cartilaginoso e regeneração axonal. São comumente estudados para o tratamento da LME (WANG *et al.*, 2017; FAN *et al.*, 2018; NOVAIS *et al.*, 2021). Além disso, especificamente para a LME, preenchem a cavitação criada pela lesão, reduzindo-as e inibindo a formação de cicatriz glial (SOARES *et al.*, 2017). Tais hidrogéis apresentam características peculiares como a capacidade de formar redes tridimensionais que podem auxiliar no reparo dos tecidos danificados, além de serem biocompatíveis, biodegradáveis, apresentarem propriedades químicas, físicas e biológicas ajustáveis (KORNEV *et al.*, 2018). Formulações de hidrogéis de GelMA podem ser utilizadas como arcabouço para liberação de fármacos, favorecendo dessa forma sua administração na área da lesão (NICHOL *et al.*, 2010; KWON *et al.*, 2018). Outra característica específica do GelMA é sua capacidade de fotopolimerização, que facilita sua obtenção na forma de hidrogel no local da lesão.

Outra estratégia interessante no contexto do tratamento da LME é a utilização de NTC. Os nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCPM) tem sido explorado na regeneração tecidual (VASCONCELOS *et al.*, 2020), por apresentarem propriedades interessantes, tais como, propriedades químicas e elétricas, serem capazes de carrear fármaco por serem passíveis de funcionalização e por apresentar morfologia cilíndrica semelhantes à dos dendritos neuronais (FABBRO *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2017, KUMAR *et al.*, 2017; KURBANOGU e OZKAN, 2018).

Apesar da capacidade do hidrogel de GelMA de se ajustar a área de lesão e limitar a formação da cicatriz glial bem como obter resultados promissores para a recuperação sensório-motora em modelo murino (NOVAIS *et al.*, 2021), outros fatores são de extrema

importância, como a limitação da cascata inflamatória desencadeada após o trauma. A capacidade dos biomateriais e dos NTC de atuarem como transportadores de fármaco, permitem a administração de moléculas anti-inflamatórias e/ou antioxidantes no local acometido. Assim é possível atuar diretamente na sequência de eventos após os danos neuronais, com intuito de restabelecer a função sensorial e motora, minimizando o processo inflamatório e o estresse oxidativo.

A modulação do processo inflamatório é possível ocorrer utilizando substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias. Moléculas provenientes de produtos naturais são amplamente estudadas com esta finalidade. Neste sentido, destacam-se as isoflavonas extraídas da própolis vermelha, que podem ser utilizadas no tratamento de doenças degenerativas do SNC a exemplo da LME. O extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV) apresenta na sua composição química substâncias como os flavonoides (formononetina, daidzeína, biochanina-A) que possuem ação antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora (BARBOSA *et al.*, 2015; MEDONÇA *et al.*, 2015; do NASCIMENTO *et al.*, 2019). Estas moléculas podem ser utilizadas para funcionalizar NTC, gerando um sistema de liberação de fármacos (MORAIS *et al.*, 2020; VASCONCELOS *et al.*, 2020). Entretanto, a funcionalização de NTCPM utilizando extratos contendo diferentes substâncias, a exemplo do EHPV ainda não foram estudadas. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver formulações de hidrogel de GelMA contendo NTCPM funcionalizados com EHPV para o tratamento *in situ* da lesão medular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

A amostra de EHPV utilizada foi padronizada por Novais *et al.* (2021), apresentando em sua composição 2,35% de formononetina (Ft), 1,85% de biochanina A (BioA), 0,23% de liquiritigenina e 1,65% de daidzeína. Salvo indicação em contrário, os demais materiais foram adquiridos da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

2.2 Funcionalização de nanotubos de carbono

2.2.1 Oxidação do NTC

O processo de oxidação dos NTC de parede múltipla NTCPM foi realizado com o tratamento ácido seguindo a metodologia de Moraes *et al.* (2020) e Vasconcelos *et al.* (2020). Para o tratamento ácido, foi utilizado 3 g do NTCPM em 100 mL de solução aquosa contendo

15% de ácido nítrico e 15% de ácido sulfúrico. Após a homogeneização por 24 h, as amostras foram submetidas a lavagens com água destilada para atingir o pH 7,0, seguindo-se de secagem do material na estufa a 100°C por 24 a 48 h. O produto foi nomeado de NTCAPM.

2.2.2 Ancoramento das isoflavonas presentes no EHPV no NTCAPM

O ancoramento das moléculas no NTCAPM foi realizado seguindo a metodologia de Vasconcelos *et al.* (2020). As amostras foram obtidas pela mistura de 0,1 g do extrato (EHPV) e 0,1 g do (NTCAPM), em 10 mL de água destilada. O processo ocorreu na ausência ou presença de reagentes oxidantes (18 mg de ácido ascórbico em 10 mL de água destilada na presença de 2 µL de peróxido de hidrogênio). As amostras foram homogeneizadas por 3 h a 25° C e posteriormente passou por um processo de diálise em água destilada com trocas constantes por 72 h e secos por 24h a 80°C na estufa.

As amostras resultantes deste processo foram nomeadas NTCAPM-EHPV e NTCAPM-EHPV (ox) em função da ausência ou presença do meio oxidativo durante a reação. Uma amostra controle em condição oxidante também foi realizada, obtendo-se NTCAPM (ox).

2.3 Caracterização do NTCPM

2.3.1 Dispersão e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Para caracterizar as amostras NTCAPM, NTCAPM (ox), NTCAPM-EHPV e NTCAPM-EHPV (ox) quanto dispersibilidade foi homogeneizando 1 mg das amostras em 30 mL tampão fosfato (pH 7,4) e aspectos macroscópicos foram observados. A morfologia e estrutura tubular foi utilizada a Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) usando o JEOL 1011 TEM (Tóquio, Japão), operando em aceleração de 60kV. As imagens foram importadas para o software ImageJ versão 1.8.0 e analisadas usando uma macro interna para obter o diâmetro médio do NTCPM que foi medido a partir de 15 repetições (CIRILLO *et al.*, 2013; MORAIS *et al.*, 2020).

2.3.2 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

Os espectros FTIR antes e depois da funcionalização foram registrados em pastilhas de KBr. A análise foi realizada na faixa de varredura de 4000–400 cm⁻¹ no espectrofotômetro PerkinElmer Spectrum™ 3FT-IR (Waltham, MA, EUA).

2.3.3 Espectroscopia Raman

Para obtenção dos espectros de Raman foi utilizado um espectrômetro Raman Confocal Horiba Scientific, modelo T64000 e a excitação do comprimento de onda foi de 532 nm, sendo analisadas as amostras NTCAPM, NTCAPM (ox), NTCAPM-EHPV, NTCAPM-EHPV (ox), bem como a mistura física dos componentes (MF) (MORAIS *et al.*, 2020; VASCONCELOS *et al.*, 2020).

2.3.4 Análise Térmica (TGA)

As curvas termogravimétricas das amostras NTCAPM, NTCAPM (ox), NTCAPM-EHPV, NTCAPM-EHPV (ox) e MF foram obtidas utilizando o equipamento Analisador Térmico SDT Q600 - TA Instruments com uma taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de nitrogênio (LING *et al.*, 2013; MORAIS *et al.*, 2020; VASCONCELOS *et al.*, 2020).

2.4 Formulação do hidrogel

2.4.1 Preparo do pré-polímero de GelMA

O pré-polímero de GelMA foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Vasconcelos *et al.* (2020). A gelatina na concentração de 10% (m/v) foi preparada em solução de tampão fosfato pH 7,4 a 60°C sob agitação durante 60 minutos. Posteriormente foi adicionado anidrido metacrílico gota a gota até completar 1% sob condições de agitação constante. A mistura foi deixada em homogeneização durante 3 h a 50°C. Em seguida, o material foi submetido à diálise em água destilada por 5 dias seguindo de liofilização.

2.4.2 Preparo das formulações de GelMA

A dispersão do pré-polímero (GelMA) foi preparada de acordo com o método descrito por Bertassoni *et al.* (2014). Foram pesados 0,005 g de 2-hidroxi-1-[4-(2-hidroxietoxi) fenil]-2-metil-1-propanona (Irgacure 2959) e adicionados em 1 mL de tampão fosfato pH 7,4. A mistura foi homogeneizada em vortex por 10 min e submetida à temperatura de 80°C por mais 10 min. Posteriormente, esta solução foi deixada em banho-maria (37°C/10 min) e 0,1 g de pré-polímero foram adicionados, seguindo-se de nova homogeneização.

Para a obtenção das formulações de GelMA contendo EHPV (GelMA-EHPV), a dispersão de GelMA (995 µL) foi homogeneizada com 5 µL de uma solução de EHPV

previamente preparada em etanol 70%. A solução de EHPV foi obtida pela total dissolução de 0,01 g do extrato em 50 µL de álcool a 70%. A concentração final do EHPV nas formulações foi de 1 mg/mL.

Para a obtenção das formulações contendo NTCAPM, as amostras foram incorporadas na dispersão polimérica do GelMA, obtendo-se também uma concentração final de 1 mg/mL de nanotubo, formando assim as amostras nomeadas GelMA-NTCAPM, GelMA-NTCAPM-EHPV, GelMA-NTCAPM (ox) e GelMA-NTCAPM-EHPV (ox).

2.4.3 Preparo do hidrogel de GelMA por fotopolimerização e propriedades de intumescimento

Para obtenção dos hidrogéis, as formulações foram submetidas ao processo de fotopolimerização. Os experimentos de viabilidade da formação do hidrogel foram realizados utilizando diferentes volumes (1 a 10 µL) das formulações. As amostras foram expostas a luz UV (6,7 mW. cm⁻²/360-480 nm) durante diferentes períodos de exposição (10 a 180 s).

O teste de intumescimento do hidrogel foi realizado de acordo com Nichol *et al.* (2010). As formulações (2 µL) foram fotopolimerizadas por exposição à luz UV por 60 s. Os hidrogéis foram pesados e submersos em tampão fosfato pH 7,4. Após 24 h, o tampão foi retirado e o excesso de líquido na superfície foi cuidadosamente eliminado com ajuda de papel absorvente. Os hidrogéis foram novamente pesados e o percentual de intumescimento (%) calculado. Foram realizadas dez replicatas de cada amostra.

2.5 Avaliação da efetividade *in vivo*

A avaliação da efetividade *in vivo* foi realizada utilizando as amostras de GelMA, GelMA-EHPV, GelMA-NTCAPM, GelMA-NTCAPM-EHPV (Quadro 1). Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Tiradentes (UNIT) pelo parecer consubstanciado pelo número: 030419 (Anexo 1).

Foram utilizados 36 ratos adultos *Wistar (Rattus norvegicus albinus)* (n=6 por grupo), fêmeas, com idade entre dois e três meses, pesando entre 150-250 g. Os animais foram agrupados em gaiolas de polipropileno padrão em número de três, mantidos em ambiente controlado, com ciclo claro/escuro de 12h, recebendo água *ad libitum* e ração balanceada padrão (Labina®).

Quadro 1. Distribuição dos grupos experimentais.

Grupos	Hemissecção bilateral	Tratamento (2 µL em cada hemissecção)
Laminectomia (LAM)	-	-
Veículo (lesão)	X	Solução tampão de fosfato (pH = 7,4)
GelMA	X	Hidrogel GelMA (10%)
GelMA-EHPV	X	Hidrogel GelMA (10%) contendo EHPV
GelMA-NTCAPM	X	Hidrogel GelMA (10%) contendo NTCAPM
GelMA-NTCAPM-EHPV	X	Hidrogel GelMA (10%) contendo NTCAPM-EHPV

2.5.1 Procedimento cirúrgico para lesão medular

A lesão medular foi realizada conforme descrito nos estudos de Fan *et al.*, (2020) e Novais *et al.* (2021). Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal utilizando cloridrato de ketamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (14 mg/kg). Os animais, em decúbito esternal com o dorso exposto, foram submetidos a tricotomia e assepsia (região torácica). Na altura das vértebras T9 e T10 (localizadas por palpação das apófises espinhosas) foi realizada uma incisão (5 cm) sob a linha média da região torácica, com posterior afastamento subperiosteal da musculatura perivertebral. O processo espinhoso deste local foi removido (laminectomia), expondo o canal medular.

A realização da lesão medular por hemissecção bilateral ocorreu com o auxílio de uma microtesoura e um bisturi nos ratos de todos os grupos, exceto o grupo LAM. A hemissecção bilateral é realizada a partir de uma incisão transversal e bilateral até a linha média, sem romper a extensão da medula. Após a incisão os animais dos grupos lesionados receberam 2 µL das suas respectivas formulações em cada hemissecção e foram expostos a radiação UV (360-480 nm, 6,7 mW cm²) por 60 s, promovendo fotopolimerização *in situ* (Vasconcelos *et al.*, 2020). Os animais do grupo veículo receberam o mesmo volume de tampão fosfato e também foram submetidos à radiação. A musculatura e pele foram suturadas (fio 4.0 de poliamida absorvível), seguindo-se da assepsia do local e administração da antibioticoterapia. Os animais receberam os cuidados conforme princípios éticos no uso de animais (CONCEA) definidas na Lei 11.794/2008. Após 7 dias da lesão, os animais foram eutanasiados e as medulas foram removidas, processadas, fixadas e incluídas em blocos de parafina.

2.6 Protocolo de avaliação da função motora

As avaliações motoras foram realizadas antes da cirurgia (tempo zero), 24 horas, 3 e 7 dias após lesão e tratamento *in situ*. Foi utilizado o protocolo descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) (BASSO *et al.*, 1995), que observa os movimentos das patas, coordenação,

firmeza e comportamento do tronco. Foram determinados em escores de pontuação que variam de 0 (ausência de movimento) a 21 (movimentação fisiológica) (anexo 2) após a observação dos animais durante 5 min (anexo 2).

2.7 Análise Estatística

Para os testes de avaliação motora (BBB) e determinação do índice de intumescimento, os dados foram submetidos à análise de normalidade de Shapiro Wilk para verificação do tipo de distribuição dos dados. Os dados apresentaram distribuição paramétrica e foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi 0,05.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos NTCPM

Foi verificado o aumento da dispersibilidade dos NTCPM após funcionalização utilizando o EHPV, demonstrando que houve alteração na sua solubilidade e estabilidade física, evitando aglomeração (HOU *et al.*, 2018). A funcionalização é a etapa que garante estas características. Foi observado que o NTCPM apresenta aspecto granulado com baixa dispersão em meio aquoso (Figura 1A). Após o processo de funcionalização foi observado que à medida que a reação ocorreu, o produto se apresentou mais disperso e finamente dividido. A funcionalização do NTCPM, tanto com o tratamento ácido (NTCAPM), como após a segunda etapa de funcionalização (NTCAPM (ox), NTCAPM-EHPV, NTCAPM-EHPV (ox)) promoveram o aumento da dispersibilidade, sendo mais evidente nos grupos funcionalizados com EHPV (Figura 1B, 1C, 1D e 1E respectivamente).

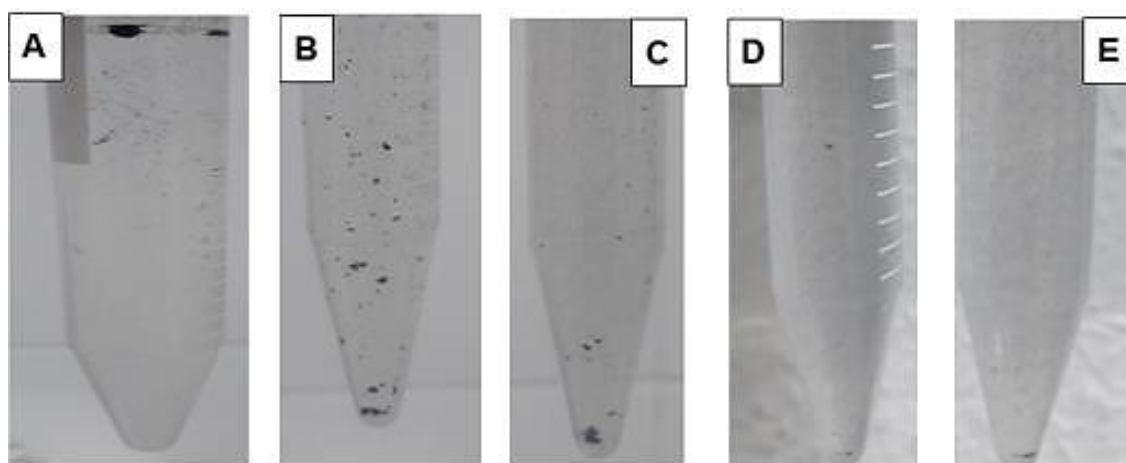


Figura 1. Dispersibilidade dos NTCPM em tampão fosfato pH 7,4 (1A) NTCPM (nanotubo de carbono de parede múltipla), (1B) NTCAPM (NTCPM após tratamento ácido), (1C) NTCAPM (ox) (NTCAPM tratado em ambiente oxidativo), (1D) NTCAPM-EHPV (NTCAPM tratado com EHPV), (1E) NTCAPM-EHPV (ox) (NTCAPM tratado com EHPV em ambiente oxidativo).

Di Crescenzo *et al.* (2014) afirmaram que os NTC interagem entre si por meio de forças de van der Waals. Hoa *et al.* (2018) mostraram que a oxidação dos NTCPM utilizando ácidos aumenta a dispersibilidade e solubilidade das amostras. Os NTCAPM em soluções neutras apresentam grupos ionizados (ânions carboxilatos -COO^-), que promovem a repulsão entre si, favorecendo a dispersibilidade do material (SHIEH *et al.*, 2012). O ancoramento dos flavonoides presentes no EHPV exerceu função semelhante, como demonstrado por VASCONCELOS *et al.* (2020). A introdução destas moléculas nas paredes do NTCAPM dificulta as interações de van der Waals entre os nanotubos, evitando a agregação do produto.

As características morfológicas das amostras por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão estão apresentadas na Figura 2. Observou-se que a amostra do NTCPM (Figura 2A) não apresenta alterações na sua superfície e possui disposição organizada e alinhada. Na Figura 2B, observou-se que o nanotubo de carbono após o tratamento ácido (NTCAPM) apresentou deformações na superfície, com pequenas ondulações. Em (2C) e (2E) observou-se que as amostras NTCAPM-EHPV e NTCAPM-EHPV (ox) apresentaram uma maior deformação na superfície, sugerindo que houve a funcionalização do nanotubo de carbono pelas moléculas presentes no EHPV. NTCAPM (ox) (Figura 2D) apresentou um aumento das deformações quando comparado ao NTCAPM (Figura 2B). Portanto, é possível afirmar que o NTCAPM após tratamento em ambiente oxidante, gerou mais pontos de deformações, compatíveis à grupos carboxílicos obtidos durante a etapa de oxidação (tratamento ácido), sugerindo que o meio oxidante aumenta a possibilidade de geração de grupos funcionalizados (VASCONCELOS *et al.*, 2020).

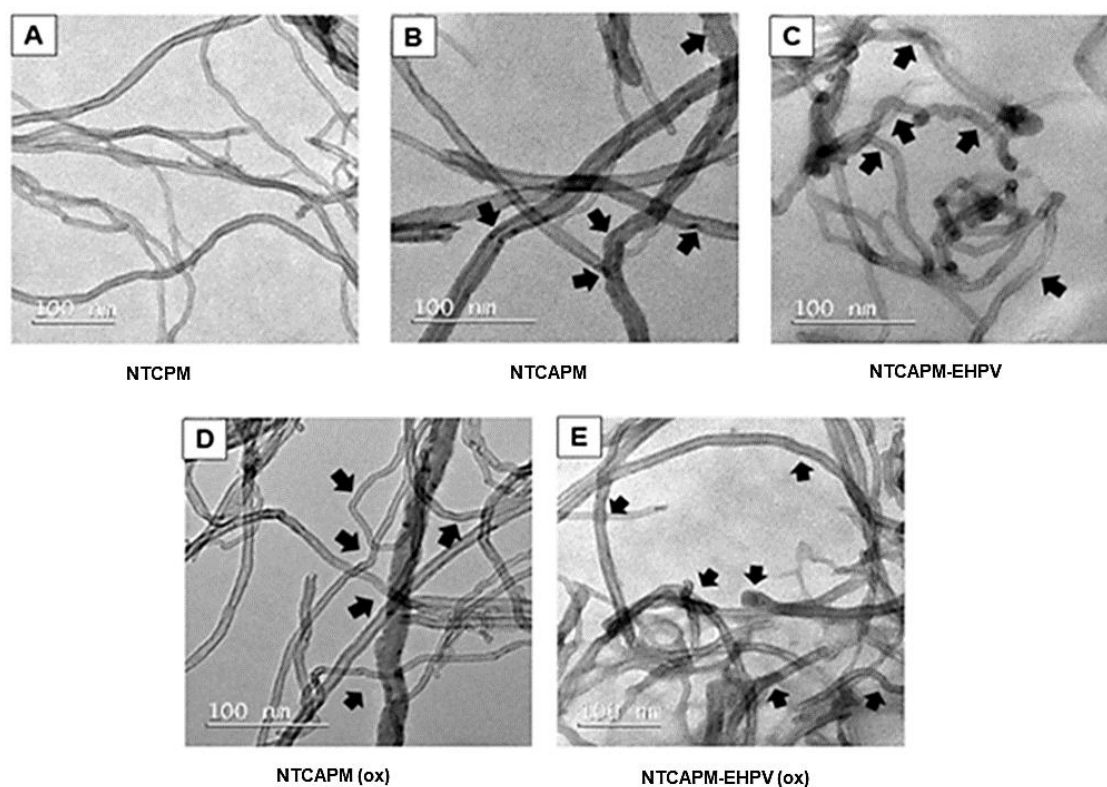


Figura 2. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das amostras (2A) NTCPM, (2B) NTCAPM, (2C) NTCAPM-EHPV, (2D) NTCAPM (ox), (2E) NTCAPM-EHPV (ox).

De acordo com Hoylos-Palacio *et al.* (2019) e Shaadan *et al.* (2020) é possível identificar nas imagens de MET alterações estruturais, deformações e/ou pontos escurecidos. Isto pode indicar que houve a inserção de grupos funcionais, moléculas ou partículas na superfície ou parede lateral dos NTCPM.

Como pode ser observado na Figura 2, o NTCPM apresentou-se de forma mais linear. Isso acontece, pois o NTCPM apresenta ligações sp^2 (π e σ) que impedem a ligação com outros grupos funcionais (WILLIAMS *et al.*, 2018). Após a funcionalização dos NTCPM, foi possível observar na Figura 2B e nas demais Figuras 2C, 2D e 2E uma desordem na disposição tridimensional dos nanotubos, os quais formaram dobras na sua estrutura (HOU *et al.*, 2017). Isso ocorreu pela inserção de grupos funcionais (-COOH- e/ou isoflavonas do EHPV) após o processo de funcionalização, que forma ligações com hibridização sp^3 (JOHN *et al.*, 2015).

Amostras de NTCAPM-EHPV apresentaram maiores alterações estruturais sugerindo o ancoramento das moléculas aos nanotubos de carbono. Além disso, foi perceptível um aspecto mais escuro na superfície, assim como dentro do nanotubo de carbono. Esses achados corroboram aos estudos realizados por Zhu *et al.* (2019) e Razzazan *et al.* (2016). Zhu *et al.* (2019) descrevem que os canais dos NTC foram bloqueados, apresentando uma coloração mais escura e promoveram a incorporação do fármaco dentro do tubo, indicando

que a funcionalização ocorre também na superfície interna do NTCPM. Razzazan *et al.* (2016) apresentaram nas imagens de MET de NTCPM contendo fármaco pontos escuros na superfície, indicando a efetiva funcionalização utilizando fármacos.

Conforme observado na Figura 3, o espectro de FTIR do NTCPM não apresentou bandas. De acordo com Liu *et al.* (2017), amostras de NTC sem qualquer funcionalização são descritas como um espectro linear, sem bandas.

A presença de uma banda intensa em 3400 cm^{-1} nos espectros de NTCAPM, NTCAPM (ox), bem como na amostra de EHPV indica a presença de grupos hidroxilas deprotonadas (MONTANHEIRO *et al.*, 2015). Os nanocompósitos formados apresentaram diferentes estados de protonação dos grupos -OH, dependendo do pH do meio que foram produzidos. Em pH menores que 3 (especificamente quando a reação ocorre em meio oxidante), os grupamentos hidroxilas de ambos precursores (NTCAPM e isoflavonóides) estão totalmente protonados. Esta condição favorece a produção de NTCAPM-EHPV (ox) via reação radicalar (CIRILLO *et al.*, 2013; VASCONCELOS *et al.*, 2020). O desaparecimento da banda próxima a 3.400 cm^{-1} em NCTAPM-EHPV (ox) reflete o desaparecimento de grupos -OH, provavelmente pelo estabelecimento de reação covalente entre NTCAPM e as isoflavonas. Este pico também se apresenta com menor intensidade na amostra de NTCAPM-EHPV, demonstrando que mesmo em pH 7,0 a reação pode ocorrer. Os grupamentos hidroxilas livres (desprotonados) aumentam com o aumento do pH reacional (Figura 3B).

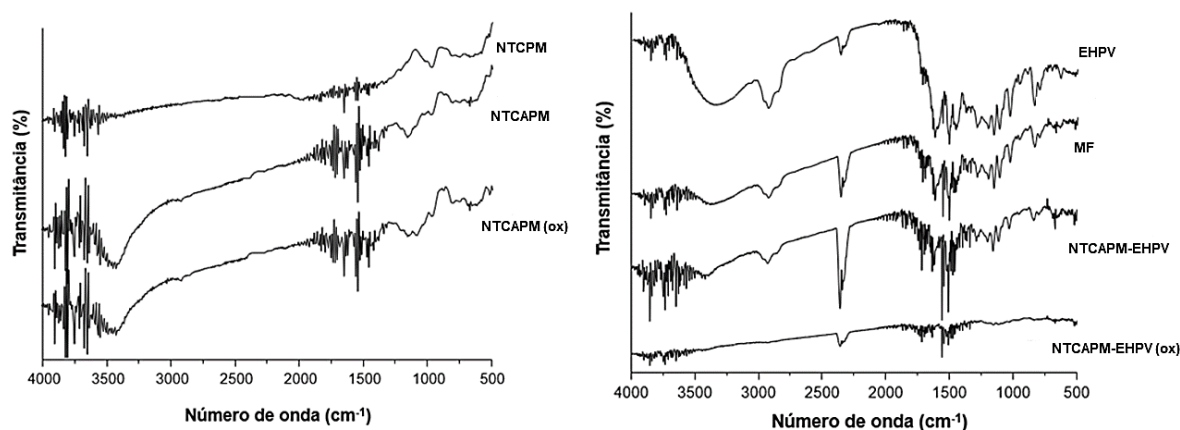


Figura 3. Espectros FTIR de NTCPM (nanotubo de carbono de parede múltipla), NTCAPM (NTCPM após tratamento com ácido), NTCAPM (ox) (NTCAPM submetido a um ambiente oxidativo), EHPV (extrato hidroetanólico de própolis vermelha), MF (mistura física de NTCPM e EHPV), NTCAPM-EHPV (NTCPM tratado com EHPV), NTCAPM-EHPV (ox) (NTCAPM tratado com EHPV em ambiente oxidativo).

A banda em 1650 cm^{-1} é referente à presença de ácidos carboxílicos na superfície do NTCPM. A funcionalização elimina a simetria do NTCPM, aumentando a geração de dipolo induzidos e sinais que podem ser detectados.

O espectro de EHPV apresenta bandas em 3400 cm^{-1} , $2950\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, $1680\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$, $1150\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$ referentes à vibração de alongamento do grupo O-H, vibrações de alongamento simétricas e assimétricas dos grupos -C-H, vibrações de alongamento de C=O de carbonila e/ou grupos aromáticos e flexões simétrica e assimétrica do grupo C-O respectivamente (De Mélo Silva *et al.* 2020). Todas estas bandas são características de isoflavonas (Figura 3B). As isoflavonas formononetina e biochanina A são os principais componentes do EHPV (LOPEZ *et al.*, 2014), sendo, portanto, condizente o perfil espectral encontrado. A mistura física (NTCAPM + EHPV) apresenta espectro com bandas similares ao espectro do EHPV, demonstrando a não interação entre as moléculas. Nos espectros das amostras funcionalizadas com EHPV observou-se o desaparecimento de bandas funcionais na região de $1400\text{ a }1700\text{ cm}^{-1}$, com especial destaque para a amostra obtida em meio oxidante (NTCAPM-EHPV (ox)).

As alterações estruturais dos NTCPM podem ser estimadas também por espectroscopia de Raman, que determina a densidade de defeitos e efetividade do processo de funcionalização. O espectro de Raman das amostras apresentou os sinais típicos em 1346 cm^{-1} correspondendo a banda D (relacionada a desordens estruturais e distorções da cadeia carbônica) e em 1576 cm^{-1} bandas G (bandas relacionadas ao modo tangencial associado a carbono com hibridização sp^2 de paredes laterais gráficas do NTC) (Figura 4) (WEPASNICK *et al.*, 2010).

Embora as bandas D e G apresentem intensidades diferentes para as diferentes amostras, a razão entre elas (ID/IG) permaneceu inalterada em todas as amostras (entre 1,002 e 1,009).

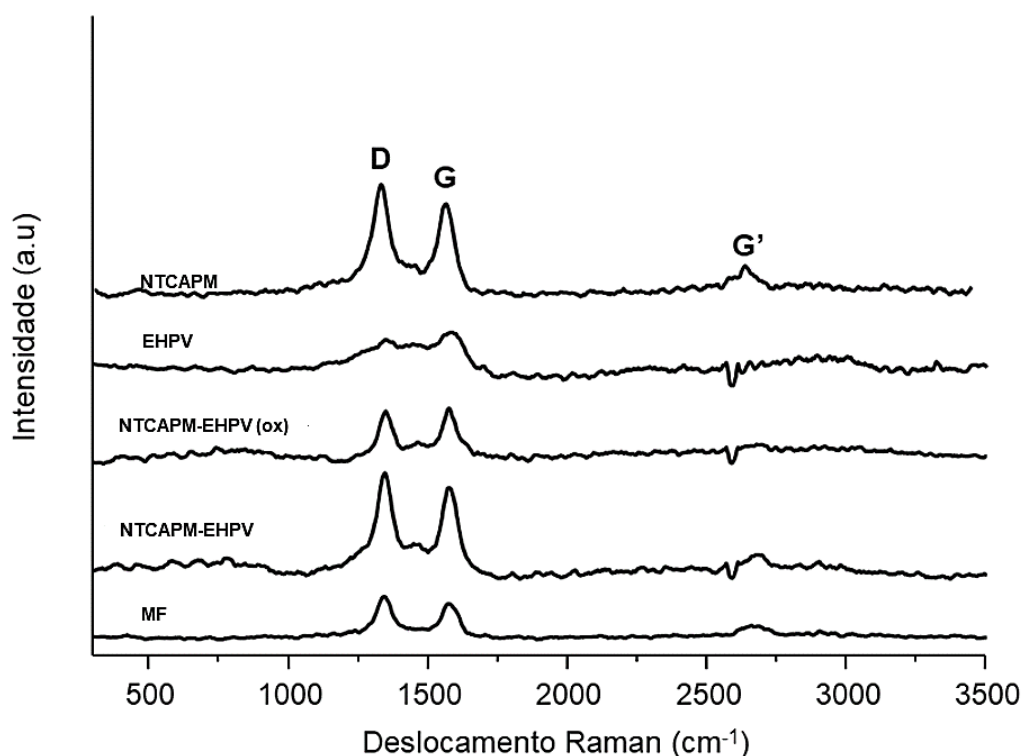


Figura 4. Espectro Raman de NTCAPM (NTCPM após tratamento com ácido), EHPV (Extrato hidroetanólico de própolis vermelha) NTCAPM-EHPV (ox) (NTCAPM tratado com EHPV em ambiente oxidativo) NTCAPM- EHPV (NTCAPM tratado com EHPV) e MF (mistura física de NTCAPM e EHPV).

A razão entre a intensidade das bandas D e G (ID/IG) é a medida quantitativa da densidade de defeitos na cadeia lateral do NTCPM. Consequentemente, a análise da razão ID/IG pode ser usada para obter informações sobre as alterações estruturais que ocorrem resultantes das estratégias de funcionalização, tais como aquelas envolvendo interações químicas (ZHU *et al.*, 2019). O aumento na razão ID/IG após funcionalização é comumente devido a interações não covalentes entre o fármaco e o NTCPM.

O perfil de termodegradação dos NTCPM pode ser observado na Figura 5. Pode ser observado que na etapa de desidratação (até 150°C), as amostras apresentaram perda de massa irrelevante (<2,0%). Na etapa de degradação (entre 150°C e 500°C), as amostras submetidas à funcionalização com EHPV apresentaram perda de massa de 30,3% e 26,5% para NTCAPM-EHPV e NTCAPM-EHPV (ox) respectivamente (Tabela 1). A amostra de EHPV nesta mesma faixa de temperatura apresentou perda de 79,9%, porém em temperatura maior (298,9°C) que as amostras de NTCPM funcionalizadas com o fármaco.

Tabela 3. Perfil térmico das amostras de nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCPM) antes e após funcionalização.

Amostra	Perda de massa (%)			Tmax (°C) (degradação) (DTG)
	0-100°C	100°C-500°C	500°C-900°C	
NTCPM	1,1	2,8	3,5	-
NTCAPM	1,9	4,0	3,4	-
NTCAPM(ox)	2,3	7,4	8,7	620,5
NTCAPM-EHPV	1,4	30,3	10,5	276,4
NTCAPM-EHPV(ox)	0,9	26,5	8,5	283,1
MF	0,9	55,3	7,9	295,0
EHPV	1,4	79,9	19,7	298,9

Foi possível observar que na mistura física, a velocidade máxima de termodegradação também ocorreu próximo a 295°C, indicando que os flavonoides, quando ancorados no NTCPM, degradam em temperaturas menores. Estas temperaturas são compatíveis com a Tmax dos principais marcadores químicos do EHPV, que varia entre 300 e 330°C (VASCONCELOS *et al.*, 2020).

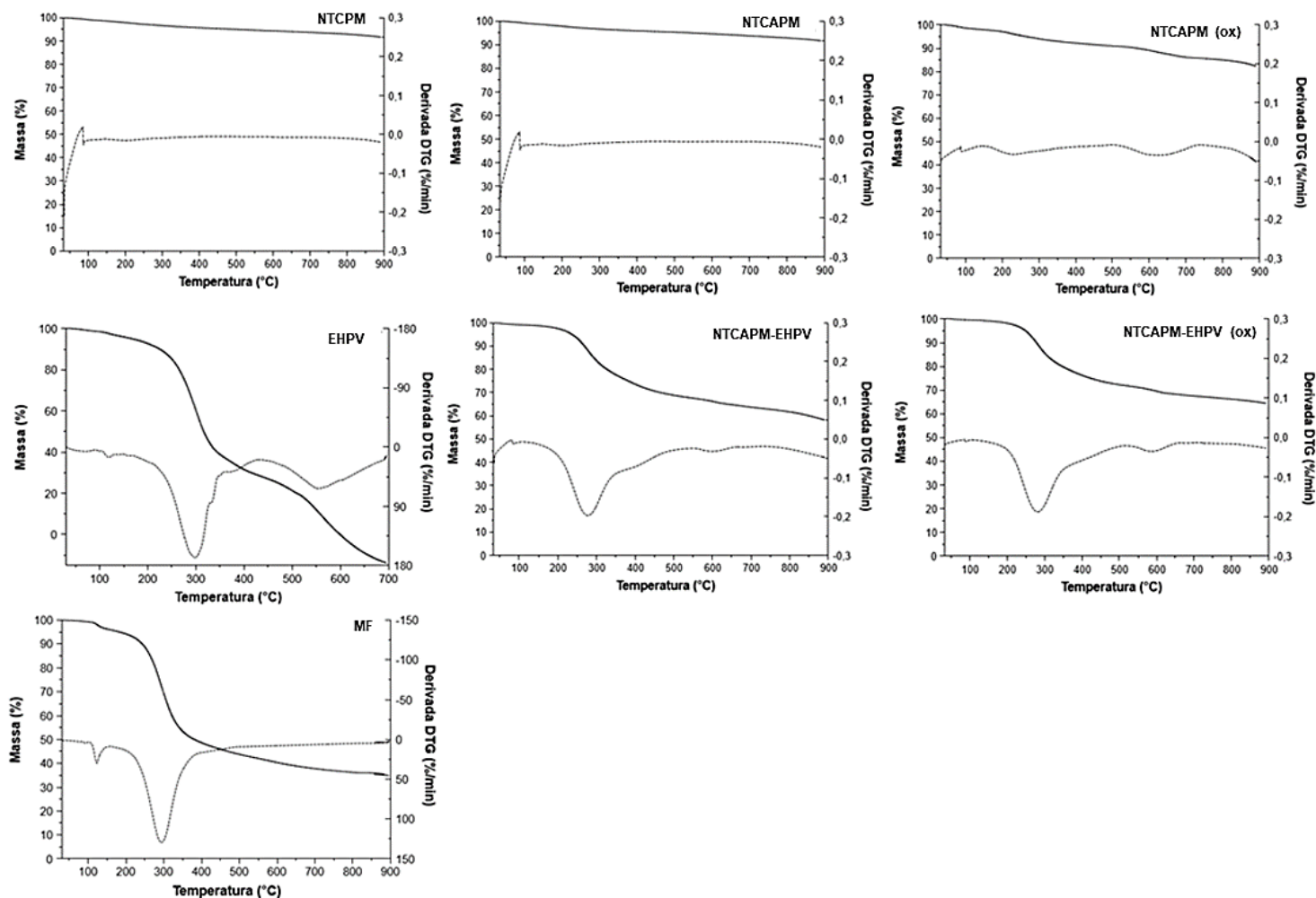


Figura 5. Curvas termogravimétricas (perda de massa em %) e derivadas (DTG em %/min). Na parte superior da figura encontram -se os resultados das amostras de nanotubo de paredes múltiplas antes da oxidação (NTCPM) seguido do NTCAPM oxidado com ácido nítrico e sulfúrico (NTCAPM) e do NTCAPM submetido à meio oxidante (peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico) após oxidação com ácidos (NTCAPM (ox)). Na parte central da figura encontram-se os resultados do extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV), e as amostras de NTCAPM funcionalizadas com EHPV na ausência de meio oxidante (NTCAPM-EHPV) e na presença (NTCAPM-EHPV (ox)). Na parte inferior encontram-se os resultados da mistura física do NTCAPM e EHPV (MF).

3.2 Caracterização das formulações

O NTCAPM funcionalizado com EHPV foi incorporado em uma formulação à base de pré-polímero de GelMA. No desenvolvimento da formulação, a capacidade de fotopolimerização do pré-polímero na presença do nanocompósito foi avaliada assim como o intumescimento do hidrogel. Estudos demonstram que a fotopolimerização não deve exceder o tempo de 60 s por ocasionar morte as células nervosas e seu intumescimento não deve ser elevado, pois promove o aumento da compressão medular. Desse modo, essas condições foram avaliadas (NICHOL *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2020).

As formulações contendo o pré-polímero (GelMA) e as amostras NTCAPM e seus derivados foram preparadas com diferentes volumes de formulação e testadas em diferentes tempos de exposição à radiação UV. Segundo Liang *et al.* (2018), a gelatina metacrilada a 10% tem sido utilizada como substrato para cultivo celular tridimensional (estudos de viabilidade e proliferação celular em vários tipos de células). De acordo com Nichol *et al.* (2010), alguns fatores como concentração do pré-polímero, tempo de exposição à radiação UV e quantidade do anidrido metacrílico para modificar a gelatina podem interferir nas características dos hidrogéis, alterando a rigidez, sendo estas condições determinantes para sua aplicabilidade. Neste trabalho, optou-se em usar GelMA a 10% produzido com anidrido, forma definida como mais viável pela maioria dos trabalhos utilizando este polímero (NICHOL *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2020; NOVAIS *et al.*, 2021). Na Figura 6 foi possível observar que as amostras de GelMA foram fotopolimerizadas a partir de 30 s utilizando entre 1 e 2 μ L, sendo necessário um tempo de 60 s para volumes maiores. Para as amostras GelMA-NTCAPM foi possível obter uma fotopolimerização a partir de 30 s com volumes de até 5 μ L. As outras formulações obtiveram fotopolimerização em tempo maior que 30 s em todos os volumes testados.

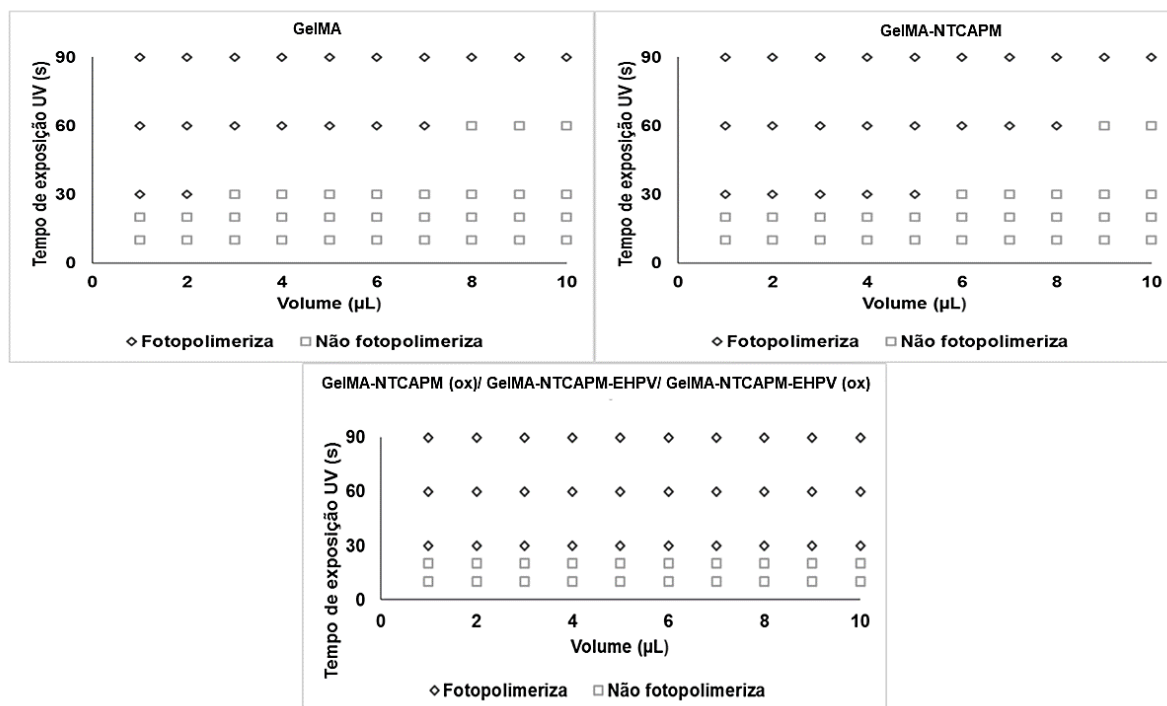


Figura 6. Influência dos volumes das formulações em relação ao tempo de exposição à radiação UV.

De acordo com Fan *et al.* (2018), hidrogéis de GelMA são rapidamente fotopolimerizados na presença de um fotoiniciador, tornando-os eficazes para serem empregados no tecido nervoso por polimerização *in situ*. Occhetta *et al.* (2016) afirmaram que a aplicabilidade do GelMA no sistema nervoso não pode exceder o tempo de 60 s de fotopolimerização, para que não ocorra morte neuronal e rigidez do material. No presente estudo, foi possível perceber que todos os grupos obtiveram fotopolimerização no tempo proposto e que os grupos contendo NTCAPM obtidos na ausência ou presença de substâncias oxidantes e o EHPV foram fotopolimerizados em volumes maiores que o polímero original em 30 s de exposição. Sugere-se que a presença de NTCAPM favorece a reação de fotopolimerização devido ao favorecimento de condução de elétrons em meio aquoso, propriedade inerente do NTCAPM. Após esta etapa do estudo foi definido que as formulações de hidrogéis seriam obtidas com 2 µL de dispersão e 60 s de exposição à radiação UV. As amostras de hidrogéis contendo NTCAPM e NTCAPM-EHPV foram obtidas contendo 0,1% de nanomaterial.

O teste de intumescimento foi realizado com intuito de observar a capacidade do hidrogel de GelMA em absorver água. O intumescimento é uma característica crucial dos polímeros que determinam suas propriedades, bem como as propriedades físicas e mecânicas. Quanto maior for a capacidade de inchaço do hidrogel melhor será o crescimento e proliferação das células (MODARESIFAR *et al.*, 2018). No entanto, para o tratamento de algumas patologias, a exemplo da LME, o intumescimento precisa ser limitado, para que não

ocorra o agravamento da lesão. De acordo com Athirasala *et al.* (2017), a concentração do polímero interfere na capacidade do hidrogel intumescer, onde quanto maior a concentração menor é o aumento da massa do hidrogel. Além da concentração polimérica, existem outros fatores que interferem no processo de intumescimento do hidrogel, como por exemplo o tamanho dos poros formados, as condições do processo de reticulação (tempo de exposição à luz UV, comprimento de onda e fotoiniciador), e a interação com os fluidos ou solventes do meio (ZHANG *et al.*, 2018).

Como pode ser observado na Figura 7, o intumescimento dos hidrogéis obtidos quando submetidos a 60 s de exposição à radiação UV obtiveram um intumescimento máximo de 65% após 24h em solução tampão. Pode-se observar que as amostras que não contém EHPV (GelMA; GelMA-NTCAPM e GelMA-NTCAPM (ox)) são iguais entre si e apresentam diferença significativa daquelas que contém o extrato (GelMA-EHPV; GelMA-NTCAPM-EHPV e GelMA-NTCAPM-EHPV (ox)). As amostras contendo EHPV, quando comparadas entre si, apresentaram o mesmo potencial de absorção de solução de tampão fosfato 0,01M pH 7,4 ($p > 0,05$).

Na literatura, hidrogéis de GelMA a 10% com fotoexposição de 60 s apresentam resultados semelhantes, com índice de intumescimento a partir de 60% em relação à sua massa inicial (WANG *et al.*, 2017; CHOI *et al.*, 2019) devido a característica hidrofílica do hidrogel (RAHALI *et al.*, 2017). Dentre os fatores que interferem no índice de intumescimento do GelMA estão a concentração do polímero e o tempo de exposição à radiação UV durante o processo de fotopolimerização (NICHOL *et al.*, 2010; MODARESIFAR *et al.*, 2017). Os hidrogéis com maior tempo de polimerização não sofrem alterações nos poros, permitindo sua expansão. Porém, neste caso, nem o tempo de exposição à luz UV, nem a concentração polimérica foram alterados. A adição de substâncias com caráter hidrofóbico (amostras contendo EHPV) provavelmente dificultou a absorção da solução aquosa.

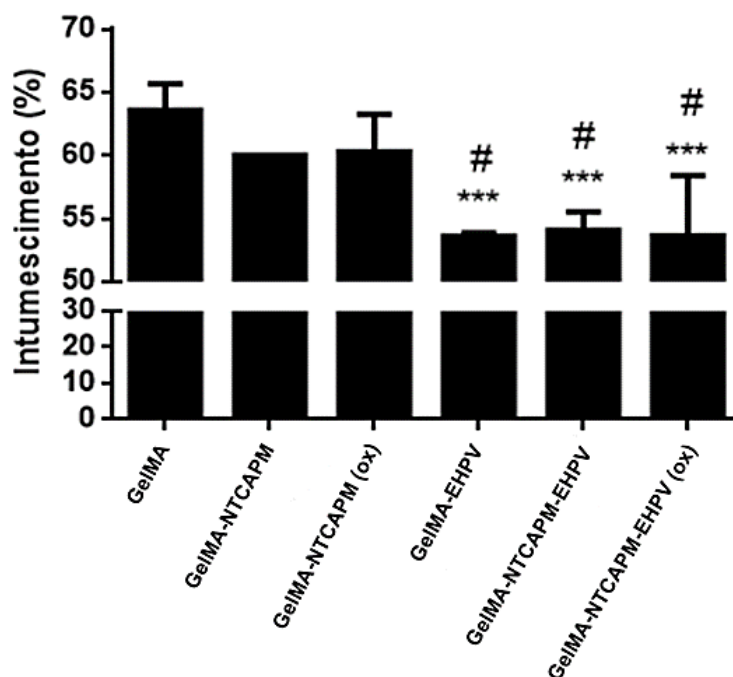


Figura 7. Perfil de intumescimento das amostras de GelMA (hidrogel de gelatina metacrilada 10%), GelMA-NTCAPM (hidrogel de GelMA contendo nanotubo de carbono), GelMA-NTCAPM (ox) (hidrogel de GelMA-NTCAPM obtido em meio oxidante) GelMA-EHPV (GelMA contendo extrato hidroetanólico de própolis vermelha 0,1%); GelMA-NTCAPM-EHPV (GelMA contendo NTCAPM funcionalizado com EHPV) e GelMA-NTCAPM-EHPV (ox) (GelMA contendo NTCAPM-EHPV obtido em meio oxidante). Meio de intumescimento: solução de tampão fosfato 0,01 mol/L pH 7,4. ***amostras com diferença significativa ($p < 0,001$) em relação a amostras de GelMA; # amostras com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras GelMA-NTCAPM e GelMA-NTCAPM (ox). ANOVA seguido de Tukey.

Esses resultados mostraram que as amostras contendo EHPV possuem menor capacidade de absorção de soluções aquosas neutras quando comparadas àquelas formulações que não o contém. De Lima *et al.* (2016) utilizaram hidrogel de ácido poliacrílico com PVA (álcool polivinílico) associado ao EHPV e observaram redução do intumescimento quando o hidrogel foi associado ao extrato. De acordo com Chao *et al.* (2018), componentes presentes em extratos de própolis veiculadas em hidrogéis de poliuretano, diminuem significativamente o intumescimento do gel, por apresentar na sua composição moléculas com características hidrofóbicas.

3.3 Ensaio biológico

Nos ensaios *in vivo*, após o procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à análise da atividade motora por meio do teste de BBB. Esse teste é importante para se avaliar o efeito neuroprotetor do EHPV e do NTCAPM sobre a LME (VASCONCELOS *et al.*, 2020; NOVAIS *et al.*, 2021).

Antes da cirurgia, os diferentes grupos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si em relação a análise das funções motoras, apresentando escores de 21

pontos. Após 24 h do procedimento cirúrgico, todos os animais lesionados apresentaram escores médios significativamente menores (BBB=0) do que os do grupo LAM (BBB=17) ($p < 0,001$) (Figura 8). Esse resultado para o grupo lesão/veículo já era esperado, uma vez que o acometimento da medula tem por consequência a perda da atividade sensório-motora do nível da lesão para baixo (ROUANET *et al.*, 2017).

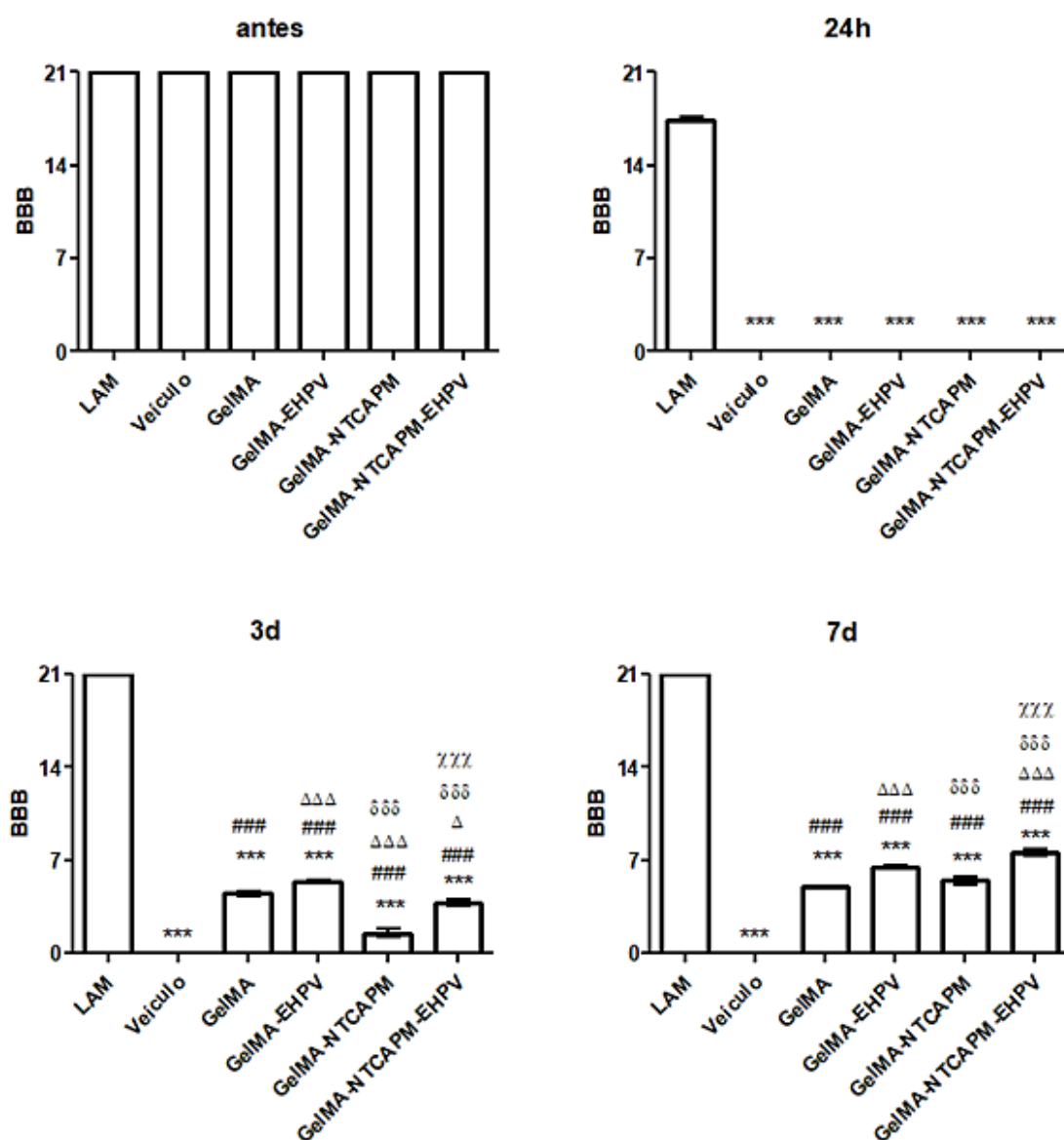


Figura 8. Avaliação funcional pela escala BBB dos grupos laminectomia (LAM), tratados com veículo, hidrogel de gelatina metacrilada (GelMA), GelMA contendo extrato hidroetanólico de própolis vermelha (GelMA-EHPV), GelMA contendo nanotubo de carbono de parede múltipla GelMA-NTCAPM, GelMA-NTCAPM funcionalizado com EHPV (GelMA-NTCAPM-EHPV) avaliados antes da cirurgia, e nos tempos 24h, três e sete dias após a cirurgia. ANOVA seguida de Tukey, comparação feita entre as amostras em um mesmo tempo de análise (*) diferença dos grupos em relação ao grupo LAM para $p < 0,001$; (###) diferença dos grupos em relação ao grupo lesão para $p < 0,001$; (ΔΔΔ) diferença dos grupos em relação ao GelMA $p < 0,001$; (Δ) $p < 0,05$; (δδδ) diferença dos grupos em relação ao GelMA-EHPV $p < 0,001$; (χχχ) diferença do GelMA-NTCAPM-EHPV em relação ao GelMA-NTCAPM $p < 0,001$.

Após 3 dias da lesão/tratamento, os animais do grupo LAM já apresentaram recuperação motora total (BBB=21), enquanto o grupo lesão (tratado com veículo) manteve a pontuação mínima (BBB=0). Os demais grupos tratados (GelMA, GelMA-EHPV, GelMA-NTCAPM, GelMA-NTCAPM-EHPV) quando comparados ao grupo lesão/veículo apresentaram escores significativamente maiores ($p < 0,001$). A presença do hidrogel de GelMA na área de lesão, pode ter favorecido a recuperação funcional, por apresentar semelhança com a matriz extracelular endógena (Nichol *et al.*, 2010). A formulação apresenta estrutura 3D que promove adesão, crescimento e proliferação celular e serve de arcabouço no espaço lesionado. Assim, o hidrogel, mesmo sem qualquer substância medicamentosa, pode impedir ou limitar a formação da cicatriz glial no local da lesão, sendo a cicatriz responsável por inibir a reconexão axonal e consequentemente a perda da motricidade (FAN *et al.*, 2018).

Com 3 e 7 dias de lesão/tratamento, todos os grupos apresentaram aumento significativo nos escores em relação ao grupo Lesão/veículo. O grupo GelMA-NTCAPM mesmo com aumento significativo no escore, ainda apresentou escore menor, quando comparado aos grupos contendo EHPV. Esse resultado sugere que a funcionalização do NTCAPM com o EHPV aumenta a dispersão do nanomaterial, mantendo-o imperceptível ao sistema imunológico, além de favorecer uma ação anti-inflamatória no local, pela liberação das moléculas anti-inflamatórias do EHPV (VASCONCELOS *et al.*, 2020).

Em 7 dias, observou-se ainda que o grupo GelMA-NTCAPM-EHPV apresentou escores superiores ao grupo GelMA-EHPV. Este resultado promissor em 7 dias pode ter sido alcançado pela biodegradação do hidrogel, o qual pode ter liberado substâncias anti-inflamatórias do EHPV na área lesionada, corroborando com o estudo descrito por Novais *et al.* (2021), que obteve melhora funcional no grupo tratado com GelMA-EHPV. Por possuir propriedades elétricas semelhantes aos neurônios (VASCONCELOS *et al.*, 2020), os NTCAPM podem ter favorecido a condução elétrica *in situ*.

Quando a LME ocorre, os neurônios e a glia no local da lesão morrem e com essa morte, inicia-se a lesão secundária, na qual fatores inflamatórios são liberados na área de injúria como interleucina (IL), fator de necrose tumoral (TNF) alfa e interferon (IFN) (REN *et al.*, 2018). Com a liberação dos fatores inflamatórios, ocorre a liberação do óxido nítrico, aumentando a permeabilidade capilar e causando disfunção na barreira hemato-cerebrospinal (SAUER *et al.*, 2017). Todo o processo inflamatório pós-traumático, promove uma série de eventos celulares e moleculares, entre eles a ativação microglial/astrocítica, infiltração de macrófagos derivados da periferia, atividade mitocondrial anormal, toxicidade gerada radicais livres e estresse oxidativo (ZENG *et al.*, 2019).

O estresse oxidativo causa o desequilíbrio do sistema antioxidante, composto principalmente pelas enzimas superóxido dismutase e da catalase (LEE *et al.*, 2015). Esse

desequilíbrio aumenta consideravelmente a inflamação local. Dessa forma encontrar estratégias que possa atuar na melhora do ambiente imunológico, poderia minimizar a cascata inflamatória.

Como observado, os melhores resultados foram obtidos para as formulações contendo EHVP. Além de sua ação na funcionalização, o extrato hidroetanólico da própolis vermelha apresenta ações anti-inflamatória (BUENO-SILVA *et al.*, 2013; CAVENDISH *et al.*, 2015), antioxidante (COSTA *et al.*, 2015; MENDONÇA *et al.*, 2015) e neuroprotetora (BARBOSA *et al.*, 2015; NOVAIS *et al.*, 2021), tendo promovido a recuperação funcional e reparo axonal após a lesão do nervo ciático em ratos (BARBOSA *et al.*, 2015). O EHPV é capaz de inibir múltiplas vias de sinalização mediadas por macrófagos através da redução dos níveis de óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e genes associados à sinalização da inflamação (BUENO-SILVA *et al.*, 2016). Bueno-Silva *et al.* (2017), mostraram o potencial anti-inflamatório do EHPV pela modulação das vias NF- κ B e MapK que inibem a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Recentemente observou-se que o extrato da própolis vermelha brasileira inibiu a transcrição proteica de pNF- κ B e reduziu a produção das citocinas inflamatórias TGF- β , TNF- α e IL-6 (CORRÊA *et al.*, 2017).

Os compostos bioativos presentes no EHPV, como a formononetina e a biochanina A, também apresentam ações anti-inflamatória e antioxidante, que podem ter favorecido a neuroproteção e, destarte, a recuperação funcional. No estudo de Chen *et al.* (2012), os autores evidenciaram que a formononetina regulou a ação dos mediadores proteicos citotóxicos em células neurais após hipóxia exercendo ação neuroprotetora.

Huh *et al.* (2011), mostraram que a formononetina teve ação na regulação de fatores de transcrição que favorecem o processo de cicatrização em ratos. Ainda reduziu a formação de radicais livres, impediu a peroxidação lipídica e reduziu a inflamação. Xu *et al.* (2017), evidenciaram que a formononetina reduziu a liberação de histamina e o processo inflamatório inibindo a secreção de TNF- α , IL-1 β e IL-6. De acordo com os autores o mecanismo de ação tem relação com a redução do cálcio intracelular, pela inibição da caspase-1, regulação de NF- κ B e a fosforilação de I κ B, prevenindo a inflamação. A formononetina quando administrada de forma isolada ou associada a outros flavonoides, reduziu o estresse oxidativo na doença de Alzheimer (OCCHIUTO *et al.*, 2009). Cavendish *et al.* (2015), mostraram que a administração da formononetina em modelos de inflamação reduziu a migração de leucócitos induzidos por carragenina além da formação de edema.

O papel da biochanina como protetor frente à inflamação também tem sido descrito em diferentes condições patológicas, inclusive a neuroinflamação (FELIX *et al.*, 2022). A biochanina A protegeu neurônios dopaminérgicos e diminuiu a ativação microglial e os níveis de óxido nítrico e TNF α frente à estimulação por lipopolissacarídeos (WAGN *et al.*, 2016) e foi neuroprotetora contra o dano causado por isquemia em roedores (GUO *et al.*, 2021).

Finalmente, formulações de GelMA e GelMA-EHPV promoveram recuperação funcional e este efeito foi acompanhado da diminuição da inflamação no local lesão, com redução de hemorragia, células inflamatórias e cavitação (NOVAIS *et al.*, 2021).

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que é possível a funcionalização do NTCPM utilizando EHPV. A fotopolimerização do pré-polímero GelMA ocorreu em tempo adequado. A fotopolimerização ocorreu *in situ*, com resultados promissores para o tratamento da LME, onde foi possível observar melhora funcional significativa, principalmente do grupo contendo o NTCAPM- EHPV.

REFERÊNCIAS

AHADIAN, S.; YAMADA, S.; AZCÓN, J.R.; ESTILE, M.; LIANG, X.; NAKAJIMA, K.; SHIKU, H.; KHADEMHOSEINI, A.; MATSUE, T. Hybrid hydrogel-aligned carbon nanotube scaffolds to enhance cardiac differentiation of embryoid bodies. *Acta Biomaterialia* 2015; 1-34.

AHUJA, C.S.; NORI, S.; TETREAULT, L.; WILSON, J.; KWON, B.; HARROP, J.; CHOI, D.; FEHLINGS, M.G. Traumatic Spinal Cord Injury-Repair and Regeneration. *Nature Reviews Disease Primers*, 2017; 3 (17018): 1-21.

ALENCAR, S.M.; NAPIMOGA, M.H.; ROSALEN, P.L. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 2016; 23(13), 1583-1590.

ANJUM, A.; YAZID, M.D.; DAUD, M.F.; IDRIS, J.; HWEI NG, A.M.; NAICKER, A.S. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. *Molecular sciences* 2020; 21:7533.

BALDO, S. *et al.* Carbon nanotube-based sensing devices for human Arginase-1 detection. *Sens. Bio-Sens. Res.*, 2016; 7: 168–173.

BARBOSA, R.A.; NUNES, T.L.; NUNES, T.L.; PAIXÃO, A.O.; BELO, N.R.; MOURA, S. ALBUQUERQUE JR, R.L.C.; CÂNDIDO, E.A.; PADILHA, F.F.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; GOMES, M. Z.; CARDOSO, J.C. Hydroalcoholic extract of red propolis promotes functional recovery and axon repair after sciatic nerve injury in rats. *Pharm Biol* 2015; 54:993-1004.

BARROS, T.E.P.F.; ARAUJO, F.F.D.; HIGINO, L.D.P.; MARCON, R.; CRISTANTE, A.F. The effect of monosialoganglioside (GM-1) administration in spinal cord injury. *Acta ortopedica brasileira* 2016; 24 (3): 123-126.

BAS, O.; PARDO, E.M.J.; CHHAYA, M.P.; WUNNER, F.M.; JEON, J.E.; KLEIN, T.J. *et al.* Enhancing structural integrity of hydrogels by using highly organised melt electrospun fibre constructs. *European Polymer Journal* 2015; 1-13.

BATISTA, C.M.; ALVES, A.V.F.; QUEIROZ, L.A.; LIMA, B.S.; ARAÚJO, A.A.S.; BAZMANDEGAN, G.; BOROUSHAKI, M.T.; SHAMSIZADEH, A.; AYOABI, F.; HAKIMIZADEH, E.; ALLAHTAVAKOLI, M. Brown propolis attenuates cerebral ischemia-induced oxidative damage via affecting antioxidant enzyme system in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 85: 503-510.

BEL, E.A.D.; SILVA, C.A.; MLADINIC, N. The Spinal Cord Injury. *Coluna-columna* 2009; 8(4): 441-9. BERTASSONI, L.E.; CARDOSO, J.C.; MANOHARAN, V.; CRISTINO, A.L.; BHISE, N.S.; BHUSHAN, B. Introduction to nanotechnology. In: Springer handbook of nanotechnology. *Springer, Berlin, Heidelberg* 2017;1-19.

BHUSHAN B. Introduction to Nanotechnology. In: Springer Handbook of Nanotechnology. Springer Berlin Heidelberg; 2017. p. 1–19.

BICAN, O.; MINAGAR, A.; PRUITT, A.A. A The Spinal Cord: A Review of Functional Neuroanatomy. *Neurologic Clinic* 2013; 31(1): 1-18.

BRACKEN, M.B.; SHEPARD, M.J.; HOLFORD, T.R.; LEO-SUMMERS, L.; ALDRICH, E.F.; FALZ, M.; *et al.* Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury: results of the third national acute spinal cord injury randomized controlled trial. *Jama* 1997; 277 (20): 1597-1604.

BUENO-SILVA, B.; FRANCHIN, M.; ALVES, C.F.; DENNY, C.; COLON, D.F.; CUNHA, T.M.;

BUENO-SILVA, B.; KAWAMOTO, D.; ANDO-SUGUIMO, S.E.; CASARIN, R.C.V.; SEVERINO, E.; ALENCAR, M.S.; ROSALEN, P.L.; MAYERA, M.P.A. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. *Journal of Ethnopharmacology* 2017; 207(31):100-107.

BUENO-SILVA, B.; KOO, H.; FALSETTA, M.L.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Effect of neovestitol-vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. *Biofouling* 2013; 29(10):1233-1242.

CAVENDISH, R.L.; de SOUZA, J.S.; NETO, R.B.; PAIXÃO, A.O.; OLIVEIRA, J.V.; ARAUJO, E.D.; *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *Journal of ethnopharmacology* 2015; 173: 127-133.

CHOW, D.S.L.; TENG, Y.; TOUPS, E.G.; AARABI, B.; HARROP, J.S.; SHAFFREY, C.I.; *et al.* Pharmacology of riluzole in acute spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery: Spine* 2012; 17: 129-140.

CIRILLO, G. *et al.* Antioxidant multi-walled carbon nanotubes by free radical grafting of gallic acid: New materials for biomedical applications: Antioxidant CNT by free radical grafting. *J Pharm Pharmacology* 2011.

CORRÊA, F.R.S.; SCHANUEL, F.S.; NUNES, N.M.; COSTA, A.M.A.; DALEPRANE, J.B. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation associated transcription factor NFκB. *Biomed pharmacother* 2017; 86: 162-171.

COSTA, M.F.B.; LIBÓRIO, A.B.; TELES, F.; MARTINS, C.S.; SOARES, P.M.G.; MENESES, G.C.; RODRIGUES, F.A.P.; LEAL, L.K.A.M.; MIRONE, D.; SILVA, A.H.; MARTINS, A.M.C. Red propolis ameliorates ischemic-reperfusion acute kidney injury. *Phytomedicine*, 2015; 22:787–79.

COUILLARD-DESPRES, S.; BIELER, L.; VOGL, M. Pathophysiology of traumático espinal medula lesão. Aspectos neurológicos da lesão medular. Springer; Cham, Suíça 2017; 503–528.

DANTAS SILVA, R.P.; MACHADO, B.A.S.; BARRETO, G.D.A.; COSTA, S.S.; ANDRADE, L.N.; AMARAL, R.G.; *et al.* Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *Plos one* 2017; 12(3): 0172585.

DEPALLE, B.; QIN, Z.; SHEFELBINE, S.J.; BUEHLER, M.J. Influence of cross-link structure, density and mechanical properties in the mesoscale deformation mechanisms of collagen fibrils. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2015; 52: 1-13.

DEVEQUI-NUNES, D.; MACHADO, B.A.S.; BARRETO, G.D.A.; REBOUÇAS SILVA, J.; SILVA, D.F.; ROCHA, J. L. C.; *et al.* Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS One* 2018; 13 (12): e0207676.

DIMITRIJEVIC, M.R.; DANNER, S.M.; MAYR, W. Neurocontrol of movement in humanos with spinal medoir. *Artif. Órgãos* 2017; 39 :823–833.

EVANIEW, N.; BELLEY-CÔTÉ, E.P.; FALLAH, N.; NOONAN, V.K.; RIVERS, C.S.; DVORAK, M.F. Methylprednisolone for the treatment of patients with acute spinal cord injuries: a systematic review and meta-analysis. *Journal of neurotrauma* 2016; 33 (5): 468- 481.

FABBRO, A.; PRATO, M.; BALLERINI, L. Carbon nanotubes in neuroregeneration and repair. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2013; 65 (15) 2034-2044.

FAN, L.; LIU, C.; CHEN, X.; ZOU, Y.; ZHOU, Z.; LIN, C.; WANG, Q. Directing induced pluripotent stem cell derived neural stem cell fate with a three-dimensional biomimetic hydrogel for spinal cord injury repair. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2018; 10(21), 17742– 17755.

FEHLINGS, M.G.; VACCARO, A.; WILSON, J.R.; SINGH, A.; CADOTTE, W.; HARROP, J.S. *et al.* Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS). *Plos One* 2012; 7(2): 1-8.

FELIX, F.B.; VAGO, J.P.; BELTRAMI, V.A.; ARAÚJO, J.M.D.; GRESPAN, R.; TEXEIRA, M.M.; PINHO.V. biochanin a as a modulator of the inflammatory response: an updated overview and therapeutic potential. *Pharmacol res* 2022; 180: 106-246.

GALLI, R.; SITOCI-FICICI, K.H.; UCKERMANN, O.; LATER, R.; MAREČKOVÁ, M.; KOCH, M.; *et al.* Label-free multiphoton microscopy reveals relevant tissue changes induced by alginate hydrogel implantation in rat spinal cord injury. *Scientific reports* 2018; 8 (1): 1-13.

GAZDIC, M.; VOLAREVIC, V.; HARRELL, C.R.; FELLABAUM, C. JOVICIC, N.; ARSENIJEVIC, N.; STOJKOVIC, M. Stem cells therapy for spinal cord injury. *International journal of molecular sciences* 2018; 19(4) :1039; 2018.

GEISLER, S.A.; SABIN, A.L.; BESSER, R.R.; GOODEN, O.M.; SHIRK, B.D.; NGUYEN, Q.M.; *et al.* Biomimetic hydrogels direct spinal progenitor cell differentiation and promote functional recovery after spinal cord injury. *Journal of neural engineering* 2018; 15(2): 025004.

GENSEL, J.C; ORR, M.B. Interactions of primary insult biomechanics and secondary cascades in spinal cord injury: implications for therapy. *Neural Regeneration Research* 2017; 12(10): 1618-1619.

GUO, B.; LIAO, C.; LIU, X.; Yi, J. Preliminary study on conjugation of formononetin with multiwalled carbon nanotubes for inducing apoptosis via ROS production in HeLa cells. *Drug Design, Development and Therapy* 2018; 12: 2815.

GUO, M.M.; QU, S.B.; LU, H.J.; WANG, W.B.; HE, M.L.; SU, L.; CHEN, J.; WANG, J. Biochanin A Alleviates Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury by Suppressing Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and p38MAPK Signaling Pathway *In Vivo* and *In Vitro*. *National library of medicine* 2021; 12(12): 646-720.

HACHEM, L.D.; AHUJA, C.S.; FEHLINGS, M.G. Assessment and management of acute spinal cord injury: From point of injury to rehabilitation. *The journal of spinal cord medicine* 2017; 40 (6): 665-675.

HAUCK, A.K. & BERNLOHR, D.A. Oxidative stress and lipotoxicity. *J Lipid Res* 2016; 57 (11): 1976-1986.

HE, Z.; ZANG, H.; ZHU, L.; HUANG, K.; YI, T.; ZHANG, S.; CHENG, S. An anti-inflammatory peptide and brain-derived neurotrophic factor-modified hyaluronan-methylcellulose hydrogel promotes nerve regeneration in rats with spinal cord injury. *International journal of nanomedicine* 2019; 14: 721.

HONG, L.T.A.; KIM, Y.M.; PARK, H.H.; HWANG, D.H.; CUI, Y.; LEE, E.M.; YAHN, S.; LEE, J.K.; SONG, S.C.; KIM, B.G. An injectable hydrogel enhances tissue repair after spinal cord injury by promoting extracellular matrix remodeling. *Nature communications* 2017; 8(1) 1-14.

HUSSAIN, T.; TAN, B.; YIN, Y.; BLACHIER, F.; TOSSOU, M.C.; RAHU, N. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016; 2016.

INOUE-SHIBUI, A.; KATO, M.; SUZUKI, N.; KOBAYASHI, J.; TAKAI, Y.; IZUMI, R.; *et al.* Interstitial pneumonia and other adverse events in riluzole-administered amyotrophic lateral sclerosis patients: a retrospective observational study. *BMC neurology* 2019; 19 (1): 72.

JENDELOVA, P. Therapeutic Strategies for Spinal Cord Injury. *International Journal Molecular Sciences* 2018; 19 (10): 3200.

JOHN, A.A.; SUBRAMANIAN, A. P.; VELLAYAPPAN, M.V.; BALAJI, A.; MOHANDAS, H.; JAGANATHAN, S.K. Carbon nanotubes and graphene as emerging candidates in neuroregeneration and neurodrug delivery. *International Journal of Nanomedicine* 2015; 10: 4267.

JUDSON, T.; MIHARA, K. Minocycline-induced Hyperpigmentation. *Journal of general internal medicine* 2017; 32(1) :133-133.

KATOH, H.; YOKOTA, K.; FEHLINGS, M.G. Regeneração da conectividade da medula espinhal por meio do transplante de células-tronco e andaimes de biomateriais. *Frente. Célula. Neurosci* 2019; 13 :248.

KHORASANIZADEH, M.; YOUSEFIFARD, M.; ESKIAN, M.; LU, Y.; Chalangari M., Harrop JS, Rahimi-Movaghar V. Recuperação neurológica após lesão traumática da medula espinhal: uma revisão sistemática e meta-análise. *J. Neurosurg.* 2019; 30: 683–699.

KLOTZ, B.J.; GAWLITTA, D.; ROSENBERG, A.J.W.P.; MALDA, J.; MELCHELS, F.P.W. Gelatin-Methacryloyl hydrogels: Biofabrication-based Tissue Repair. *Trends in biotechnology* 2016; 2 (1):1-14.

KOCOT, J.; KIELCZYKOWSKA, M.; LUCHOWSKA-KOCOT, D.; KURZEPA, J.; MUSIK, I. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2018; 2018.

KOFFLER, J.; ZHU, W.; QU, X.; PLATOSHYN, O.; DULIN, J. N.; BROCK, J.; *et al.* Biomimetic 3D-printed scaffolds for spinal cord injury repair. *Nature medicine* 2019; 25 (2) 263-269.

KUMAR, S.; RANI, R.; DILBAGHI, N.; TANKESHWAR, K.; KIM, K.-H. Carbon nanotubes: a novel material for multifaceted applications in human healthcare. *Chemical Society Reviews* 2017; 46: 158–196.

KURBANOGU, S.; OZKAN, S.A. Electrochemical carbon based nanosensors: A promising tool in pharmaceutical and biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Review issue* 2018; 147: 439–457.

KWON, S.; LEE, S.S.; SIVASHANMUGAM, A.; KWON, J.; KIM, S.H.L.; NOH, M.Y.; *et al.* Bioglass-incorporated methacrylated gelatin cryogel for regeneration of bone defects. *Polymers* 2018; 10 (8): 914.

LEE, D.H.; PARK, H. Y.; LEE, U. S.; LEE, K.-J.; NOH, E. C.; JANG, J. H.; KANG, D.-H. The effects of brain wave vibration on oxidative stress response and psychological symptoms. *Comprehensive Psychiatry* 2015; 60 :99–104.

LI, H.; ZHANG, X.; ZHU, X.; QI, X.; LIN, K.; CHENG, L. The effects of icariin on enhancing motor recovery through attenuating pro-inflammatory factors and oxidative stress via mitochondrial apoptotic pathway in the mice model of spinal cord injury. *Frontiers in physiology* 2018; 9: 1617.

LI, Z.; DONG, X.; ZHANG, J.; ZENG, G.; ZHAO, H.; LIU, Y.; *et al.* Formononetin protects TBI rats against neurological lesions and the underlying mechanism. *Journal of the neurological sciences* 2014; 338 (1-2): 112-117.

LIU, T. *et al.* CNTs-CaP/chitosan-coated AZ91D magnesium alloy extract promoted rat dorsal root ganglia neuron growth via activating ERK signalling pathway. *Cell Biochemistry and Function* 2021; 39 (7): 908-920.

MALIK, N.; DHIMAN, P.; SOBARZO-SANCHEZ, E.; KHATKAR, A. Flavonoids and anthraquinones as xanthine oxidase and monoamine oxidase inhibitors: a new approach towards inflammation and oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry* 2018; 18(25): 2154-2164.

MANLEY, N.C.; PRIEST, C.A.; DENHAM, J.; WIRTH, E.D.; LEBKOWSKI, J.S. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cells: preclinical efficacy and safety in cervical spinal cord injury. *Stem cells translational medicine* 2017; 6(10): 1917-1929.

MARCON, R.M.; CRISTANTE, A.F.; BARROS, T.E.P.F.; FERREIRA, R.; SANTOS, G.B. Effects of ganglioside G (M1) and erythropoietin on spinal cord lesions in rats: functional and histological evaluations. *Clinics* 2016; 71(6):351-360.

MENDONÇA, L.S.; MENDONÇA, F.M.R.; ARAÚJO, Y.L.F.M. ARAÚJO, E.D.; RAMALHO, S.A.; NARAIN, N.; JAIN, S.; DRELLANA, S.C.; PADILHA, F.F.; CARDOSO, J.C. Chemical markers and antifungal activity of red propolis from Sergipe, Brazil. *Food Sci. Technol* 2015; 35(2): 291-298.

- MESHKINI, A.; SALEHPOUR, F.; AGHAZADEH, J.; MIRZAEI, F.; NASERI, A.S.A. Riluzole can improve sensory and motor function in patients with acute spinal cord injury. *Asian journal of neurosurgery* 2018; 13 (3): 656.
- MOHAJERI, M.; BEHNAM, B.; SAHEBKAR, A. Biomedical applications of carbon nanomaterials: Drug and gene delivery potentials. *Journal of Cellular Physiology*. 2018.
- MONEA, B.F.; IONETE, E.I.; SPIRIDON, S.I.; ION-EBRASU, D.; PETRE, A.E. Carbon Nanotubes and Carbon Nanotube Structures Used for Temperature Measurement. *Sensors (Basel)* 2019; 19 (11): 2464.
- NAGOSHI, N.; KHAZAEI, M.; AHLFORS, J.E.; AHUJA, C.S.; NORI, S.; WANG, J.; *et al.* Human spinal oligodendrogenic neural progenitor cells promote functional recovery after spinal cord injury by axonal remyelination and tissue sparing. *Stem cells translational medicine* 2018; 7(11): 806-818.
- NEVES, M.V.M.; SILVA, T.M.S.D.; LIMA, E.D.O.; CUNHA, E.V.L.D.; OLIVEIRA, E.D.J.; *et al.* Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. *Brazilian Journal Of Microbiology* 2016; 47 (1): 159-166.
- NI, J.; WU, Z.; MENG, J.; ZHU, A.; ZHONG, X.; WU, S.; NAKANISHI, H. The neuroprotective effects of Brazilian green propolis on neurodegenerative damage in human neuronal SH-SY5Y cells. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017; 2017.
- NICHOL, J.W.; KOSHY, S.; BAE, H.; HWANG, C.M.; YAMANLAR, S.; KHADEMHOSEINI, A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* 2010; 31(21): 5536-5544.
- NOVAIS, G.B.; SANTOS, D.S.; SANTANA, R.J.R.; FILHO, R.N.P.; CUNHA, J.L.S.; LIMA, B.S. *et al.* Development of a New formulation Based on *in situ* photopolymerized Polymer for the Treatment of Spinal Cord Injury. *Polymers* 2021;13(24):4247.
- PAHOFF, S.; MEINERT, C.; BAS, O.; NGUYEN, L.; KLEIN, T. J.; HUTMACHER, D. W. Effect of gelatin source and photoinitiator type on chondrocyte redifferentiation in gelatin methacryloyl-based tissue-engineered cartilage constructs. *Journal of Materials Chemistry B* 2019; 7(10):1761-1772.
- PICOLOTTO, A.; PERGHER, D.; PEREIRA, G.P.; MACHADO, K.G.; SILVA BARUD, H.; ROESCH-ELY, M.; *et al.* Bacterial cellulose membrane associated with red propolis as phytomodulator: Improved healing effects in experimental models of diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019; 112: 108640.
- PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K.; MORAES, Â.M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Química nova* 2015; 38 (7): 957-971.
- QI, C.; YAN, X.; HUANG, C.; MELERZANOV, A.; DU, Y. Biomaterials as carrier, barrier and reactor for cell-based regenerative medicine. *Protein & cell* 2015; 6(9): 638-653.
- RAHALI, K., BEN MESSAOUD, G., KAHN, C., SANCHEZ-GONZALEZ, L., KACI, M., CLEYMAND, F. *et al.* Synthesis and Characterization of Nanofunctionalized Gelatin Methacrylate Hydrogels. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017; 18(12), 2675.
- RAMOS, R.C.D.V.; ALEGRETE, N. O papel da farmacoterapia na modificação do estado neurológico de traumatizados vértebro-medulares. *Revista Brasileira de Ortopedia* 2015; 50 (6) 617-624.

SMITH, S.L.; SCHERCH, H.M.; HALL, E.D. Protective effects of tirilazad mesylate and metabolite U-89678 against blood-brain barrier damage after subarachnoid hemorrhage and lipid peroxidative neuronal injury. *Journal of neurosurgery* 1996; 84 (2): 229-233.

SUMIZONO, M.; SAKAKINA, H.; OTSUKA, S.; TERASHI, T.; NAKANISHI, K.; UEDA, K.; *et al.* The effect of exercise frequency on neuropathic pain and pain-related cellular reactions in the spinal cord and midbrain in a rat sciatic nerve injury model. *Journal of pain research* 2018; 11: 281.

SUN, M.; SUN, X.; WANG, Z.; GUO, S.; YU, G.; YANG, H. Synthesis and properties of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels and their recent applications in load-bearing tissue. *Polymers* 2018; 10(11): 1290.

UEDA, T.; INDEN, M.; SHIRAI, K.; SEKINE, S.I.; MASAKI, Y.; KURITA, H; *et al.* The effects of Brazilian green propolis that contains flavonols against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity. *Scientific reports* 2017; 7(1): 1-11.

USAL, T.D.; YUCELI, D.; HASIRCI, V. A novel GelMA-pHEMA hydrogel nerve guide for the treatment of peripheral nerve damages. *International journal of biological macromolecules* 2019; 121: 699-706.

VAN DEN BULCKE, A.I.; BOGDANOV, B.; ROOZE, N.; SCHACHT, E.H.; CORNELISSEN, M.; BERGHMANS, H. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* 2000; 1 (1): 31-38.

VASCONCELOS, A.C.P.; MORAIS, R.P.; NOVAIS, G.B.; BARROSO, S.S.; MENEZES, L.R.O.; SANTOS, S.; COSTA, L.P.; CORREA, C.B.; SEVERINO, P.; GOMES, M.Z.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R.L.C.; CARDOSO, J.C. *In situ* photocrosslinkable formulation of nanocomposites based on multi-walled carbon nanotubes and formononetin for potential application in spinal cord injury treatment. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine* 2020; 29: 102-272.

VENKATESH, K.; GHOSH, S.K.; MULLICK, M.; MANIVASAGAM, G.; SEN, D. Spinal cord injury: pathophysiology, treatment strategies, associated challenges, and future implications. *Cell and Tissue Research* 2019.

WANG, Y.; MA, M.; WANG, J.; ZHANG, W.; LU, W.; GAO, Y.; *et al.* Development of a photo-crosslinking, biodegradable GelMA/PEGDA hydrogel for guided bone regeneration materials. *Materials* 2018; 11(8):1345.

WANG, Z., TIAN, Z., MENARD, F., & KIM, K. Comparative study of gelatin methacrylate hydrogels from different sources for biofabrication applications. *Biofabrication*, 2017; 9(4): 044-101.

WANG, J.; WU, W.Y.; HUANG, H.; LI, W.Z.; CHEN, H.Q.; YIN, Y.Y. Biochanin A Protects Against Lipopolysaccharide-Induced Damage of Dopaminergic Neurons Both In Vivo and In Vitro via Inhibition of Microglial Activation. *Neurotox Res.* 2016; 30(3):486-98.

WHO. World Health Organization. Spinal Cord Injury. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury>. Acesso em: 23/08/2020.

WOŹNIAK, B.; WOŹNIAK, A.; MILA-KIERZENKOWSKA, C.; KASPRZAK, H. A. Correlation of Oxidative and Antioxidative Processes in the Blood of Patients with Cervical Spinal Cord Injury. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 6094631.

XU, X.; LI, N.; ZHU, L.; ZHOU, Y.; CHENG, H. Beneficial effects of local profound hypothermia and the possible mechanism after experimental spinal cord injury in rats. *The journal of spinal cord medicine* 2016; 39(2): 220-228.

YANG, Y.; CHAWLA, A.; ZHANG, J.; ESA, A.; JANG, H. L.; KHADEMHOSEINI, A. Applications of nanotechnology for regenerative medicine; healing tissues at the nanoscale. In: Principles of Regenerative Medicine. *Academic Press* 2019; 485-504.

YUE, K.; LI, X.; SCHROBBACK, K.; SHEIKHI, A.; ANNABI, N.; LEIJTEN, J.; *et al.* Structural analysis of photocrosslinkable methacryloyl-modified protein derivatives. *Biomaterials*, 2017.

ZENG, H.; LIU, N.; YANG, Y. Y.; XING, H. Y.; LIU, X. X.; LI, F.; LA, G. Y.; HUANG, M. J.; ZHOU, M. W. Lentivirus-mediated downregulation of α -synuclein reduces neuroinflammation and promotes functional recovery in rats with spinal cord injury. *Neuroinflammation*, 2019; 16(1):283.

ZHANG, Q.; ZHANG, L. X.; AN, J.; YAN, L.; LIU, C. C.; ZHAO, J.; YANG, H. Huangqin flavonoid extraction for spinal cord injury in a rat model. *Neural regeneration research* 2018; 13 (12):2200.

ZHOU, X.; CUI, H.; NOWICKI, M.; MIAO, S.; LEE, S. J.; MASOOD, F.; *et al.* Three-dimensional-bioprinted dopamine-based matrix for promoting neural regeneration. *ACS applied materials & interfaces* 2018; 10 (10): 8993-9001.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dois tipos de NTC (NTCAPS e NTCAPM) foram funcionalizados com as isoflavonas (BioA e Ft). O NTCAPM mostrou melhor dispersibilidade e desempenho de funcionalização. Para os ensaios *in vivo* o NTCAPM foi funcionalizado ao extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV). A fotopolimerização das formulações contendo NTCAPM associados ao EHPV, ocorreu *in situ*. A capacidade funcional foi melhorada em ratas com melhores resultados para os grupos GelMA-EHPV e GelMA-NTCAPM-EHPV.

ANEXOS

ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA



UNIVERSIDADE TIRADENTES
DIRETORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo dos mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha associado a um biomaterial utilizando modelo murino de traumatismo raquimedular", registrada com o nº 010916, sob a responsabilidade de Juliana Cordeiro Cardoso, que envolve a utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, em reunião de 28/10/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Vigência da autorização	15/11/2016 a 15/11/2017
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
Nº de Animais	90
Peso/idade	150 a 200 g / 2 a 3 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério da UNIT

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT
Prof.^a Maria Júlia Nardelli
Comitê de Ética no Uso Animal
Coordenadora

Aracaju, 28 de outubro de 2016

Maria Júlia Nardelli
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso Animal – CEUA
Universidade Tiradentes - UNIT

UNIVERSIDADE TIRADENTES
AV. MURILO DANTAS Nº 300 B. FAROLÂNDIA
CEP: 49.032-490 | ARACAJU - SE - BRASIL

TELEFONE: (79)3218 2206
FAX: (79) 3218 21 00

ANEXO 2 – ESCALA BASSO, BEATTIE E BRESNAHAN

PONTUAÇÃO	DEFINIÇÕES OPERACIONAIS DE CATEGORIAS E ATRIBUTOS
0	Nenhum movimento observável do membro posterior.
1	Movimento discreto (limitado) de uma ou das duas articulações, geralmente, do quadril e/ou do joelho.
2	Movimento extenso de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreta de uma outra.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto de todas as três articulações do membro posterior.
5	Movimento discreto de duas articulações e movimento extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e movimento discreto da terceira.
7	Movimento extenso das três articulações do membro posterior.
8	Pedalada sem suporte de peso ou apoio plantar da pata sem suporte de peso.
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente em fase de apoio (i.e., quando estático) ou passada dorsal ocasional, frequente ou consistente com suporte de peso e nenhuma passada plantar.
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
11	Passo plantar com suporte de peso frequente a consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
12	Passo plantar com suporte de peso frequente a consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior.
13	Passo plantar com suporte de peso frequente a consistente e coordenação frequente dos membros anterior e posterior.
14	Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externamente) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície (piso) bem como, antes de liberar os dedos no final da fase de apoio ou passada plantar frequente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.
15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial.
16	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação.
17	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato inicial e da liberação dos dedos.
18	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dedos.
19	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo.
20	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco.
21	Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco, cauda consistentemente elevada.