

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE MATERIAIS – POSMAT**

**GABRIELA AZEVEDO GARCIA**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE DISPOSITIVO  
VAGINAL DE ENTREGA SUSTENTADA DE DROGAS BASEADO EM  
LÁTEX NATURAL E LIPOSSOMAS PARA TRATAMENTO DE  
MIOPATIA HIPERGLICÊMICA GESTACIONAL**

**BAURU – SP**

**2023**

**GABRIELA AZEVEDO GARCIA**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE DISPOSITIVO  
VAGINAL DE ENTREGA SUSTENTADA DE DROGAS BASEADO EM  
LÁTEX NATURAL E LIPOSSOMAS PARA TRATAMENTO DE  
MIOPATIA HIPERGLICÊMICA GESTACIONAL**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais.

Orientador: Prof. Carlos Frederico de Oliveira Graeff

Co-orientadora: Profa. Emérita Marilza Vieira Cunha Rudge

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Juliana Ferreira Floriano

**BAURU**

**2023**

Garcia, Gabriela Azevedo.

Desenvolvimento e caracterização de dispositivo vaginal de entrega sustentada de drogas baseado em látex natural e lipossomas para tratamento de miopatia hiperglicêmica gestacional / Gabriela Azevedo Garcia, 2023  
128 f.: il.

Orientador: Carlos Frederico de Oliveira Graeff  
Coorientadora: Marilza Vieira Cunha Rudge  
Coorientadora: Juliana Ferreira Floriano

Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista (Unesp). Faculdade de Ciências, Bauru, 2017


1. Sistema de Entrega de Droga. 2. Liberação Sustentada. 3. Látex Natural. 4. Lipossoma. 5. Nanoencapsulação. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GABRIELA AZEVEDO GARCIA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.**

Aos 25 dias do mês de agosto do ano de 2023, às 09:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de GABRIELA AZEVEDO GARCIA, intitulada **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE DISPOSITIVO VAGINAL DE ENTREGA SUSTENTADA DE DROGAS BASEADO EM LÁTEX NATURAL E LIPOSSOMAS PARA TRATAMENTO DE MIOPATIA HIPERGLICÊMICA GESTACIONAL**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS FREDERICO DE OLIVEIRA GRAEFF (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências - Unesp/Câmpus de Bauru, Prof. Dr. ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp/Câmpus de Araraquara, Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências - Unesp/Campus de Bauru. Após a exposição pela mestrande e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final:   Aprovada   . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Prof. Dr. CARLOS FREDERICO DE OLIVEIRA GRAEFF

Documento assinado digitalmente  
 CARLOS FREDERICO DE OLIVEIRA GRAEFF  
Data: 28/08/2023 16:52:46-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Berenice Rocha de Azevedo Garcia e Márcio Alexandre Garcia Rosa:*

Por serem meu alicerce, por todo cuidado, amor e oportunidades que me proporcionaram durante todos os anos de minha vida.

*Ao meu querido companheiro Mathias Rennó Chaves:*

Por ter escolhido trilhar seu caminho junto ao meu com palavras de incentivo, apoio e carinho.

*A minha família e amigos:*

Que sempre me apoiaram e trouxeram ótimos momentos de felicidade.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff, pela oportunidade de me orientar durante o mestrado e por todos os seus ensinamentos compartilhados nesta trajetória.

A Prof. Marilza Vieira Cunha Rudge, por todas as oportunidades proporcionadas, todo o carinho, amizade e respeito que criamos no decorrer desses anos.

A Dra. Juliana Ferreira Floriano, por tudo que me ensinou, por todos os momentos em que busquei apoio e me ajudou, por todos os conselhos e por sempre me ouvir e me confortar. Sua gentileza e conhecimento serão sempre lembrados por mim.

Ao Prof. Anselmo Gomes de Oliveira, pelo apoio, conhecimento compartilhado, atenção oferecida e materiais importantes para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Paulo Noronha Lisboa Filho, por sempre me auxiliar quando recorri à sua figura e por gentilmente me auxiliar com equipamentos utilizados neste trabalho.

Ao meu amigo Rafael Guilen de Oliveira, pelo companheirismo e amizade desde o início da minha trajetória acadêmica.

Aos meus professores do programa de Ciência e Tecnologia de Materiais, por todos os ensinamentos proporcionados e deixar a ciência mais descomplicada e bela.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Novos Materiais e Dispositivos, por todo auxílio nesta trajetória.

Aos meus colegas e amigos do Projeto Diamater, por todo o apoio, risadas e conhecimento gerado.

A todos que fizeram parte desta caminhada.

*“O sucesso não é apenas o que você realiza em sua vida;  
é sobre o que você inspira os outros a fazer”*

*- Anônimo*

*“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.”*

*- Carl Sagan*

GARCIA, G. A. **Desenvolvimento e caracterização de dispositivo vaginal de entrega sustentada de drogas baseado em látex natural e lipossomas para tratamento de miopatia hiperglicêmica gestacional**. 2023. 128f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais) - UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru, 2023.

## RESUMO

O Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) pode afetar o músculo esquelético devido a miopatia hiperglicêmica gestacional (MHG), caracterizada por atrofia muscular, a qual leva à incontinência urinária (IU) até 2 anos pós-parto. Atualmente, o tratamento destas patologias é ineficaz, o que diminui a qualidade de vida da mulher e aumenta os custos em saúde pública. O uso de proteínas que atuam na regeneração muscular é uma grande estratégia para o tratamento *in loco* da MHG, porém há necessidade do desenvolvimento de dispositivos adequados e otimizados. Desta forma, o objetivo deste projeto é o desenvolvimento de modelo de dispositivo para terapia por meio da criação de um sistema vaginal de liberação transmucosa de fármacos (SVLTF) baseado em Látex Natural (LN) associado a lipossomas com fármaco atenolol (AT) encapsulado. O AT foi escolhido para os testes de liberação dos lipossomas e dispositivos por conta de suas propriedades hidrofílicas semelhantes a proteínas recrutadoras de Células-tronco Mesenquimais (CTM), as quais atuam na regeneração muscular. O LN é polímero que demonstrou importantes resultados na entrega sustentada de fármacos, além de ser biocompatível, bioativo e de baixo custo. O LN apresenta, entretanto, um perfil de liberação rápido de drogas nas primeiras horas. Visando o melhor controle da liberação da droga, foi utilizada nanoencapsulação por meio de lipossomas, os quais atuam de maneira eficiente como sistema de entrega de droga com liberação sustentada. Os lipossomas foram preparados por ultrassonicação com diferentes formulações: preparação livre de polímeros (LPS);

com acréscimo de LN (LPS-LN) e com álcool polivinílico/PVA (LPS-PVA). O fármaco AT foi encapsulado durante a ultrasonicação das preparações. Os dispositivos foram preparados com a incorporação dos lipossomas na matriz de LN. Para a caracterização foi utilizado Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), analisador de tamanho de partícula, zeta potencial, resistência mecânica, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e cinética de liberação por Espectroscopia UV-Visível. Os resultados mostraram que os lipossomas com e sem revestimento por PVA e carregados com AT exibiram diâmetro hidrodinâmico da partícula adequado para aplicação em sistemas de entrega de drogas, assim como morfologia esférica esperada de lipossomas. As nanopartículas e os dispositivos estudados demonstraram a ausência de interações significativas entre seus componentes por meio da técnica de FTIR, assim como alto potencial de deformação, corroborando com as características próprias de elastômeros. Os lipossomas e dispositivos avaliados apresentaram excelentes resultados quanto à liberação sustentada do fármaco atenolol, trazendo a otimização desejada por meio do maior controle da liberação, com potencial aplicação futura em dispositivos médicos e terapias.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sistema de entrega Vaginal, Liberação Sustentada, Látex Natural, Lipossoma, Nanoencapsulação.

GARCIA, G. A. **Development and Characterization of a Vaginal Sustained Drug Delivery Device Based on Natural Rubber Latex and Liposomes for the Treatment of Gestational Hyperglycemic Myopathy**. 2023. 128 p. Thesis (Master's degree – Post Graduate Program in Materials Science and Technology). UNESP, School of Science, Bauru, 2023.

## **ABSTRACT**

Gestational Diabetes Mellitus (GDM) can affect skeletal muscle due to gestational hyperglycemic myopathy (GHM), characterized by muscular atrophy, which leads to urinary incontinence (UI) up to 2 years postpartum. Currently, the treatment of these conditions is ineffective, reducing women's quality of life and increasing public healthcare costs. The use of proteins that promote muscle regeneration is a significant strategy for the local treatment of GHM, but the development of appropriate and optimized devices is needed. Thus, the aim of this project is to develop a device model for therapy by creating a transmucosal drug delivery vaginal system (TDVDS) based on Natural Rubber Latex (NRL) associated with liposomes containing atenolol (AT) drug. AT was chosen for liposome and device release testing due to its hydrophilic properties similar to Mesenchymal Stem Cell (MSC) recruiting proteins, which play a role in muscle regeneration. NRL is a polymer that has shown significant results in sustained drug delivery, in addition to being biocompatible, bioactive, and cost-effective. However, LN shows a burst release profile of drug in the first hours. For better drug release control, nanoencapsulation using liposomes was employed, as they efficiently act as sustained drug delivery systems. Liposomes were prepared by ultrasonication with different formulations: liposomes with polymer-free preparation (LPS); with the addition of NRL (LPS-NRL); and with polyvinyl alcohol/PVA (LPS-PVA).

AT was encapsulated during the ultrasonication of the preparations. The devices were prepared by incorporating prepared liposomes into the NL matrix. Characterization was performed using Scanning Electron Microscopy (SEM), particle size analyzer, zeta potential, mechanical resistance, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), and UV-Visible spectroscopy for release kinetics. The results showed that liposomes with and without PVA coating, loaded with AT, exhibited a hydrodynamic particle diameter suitable for drug delivery systems, as well as the expected spherical morphology of liposomes. The nanoparticles and devices studied demonstrated the absence of significant interactions between their components through the FTIR technique, as well as a high potential for deformation, confirming the characteristics of elastomers. The liposomes and evaluated devices showed excellent results in sustained release of atenolol, bringing the desired optimization through better release control, with potential future applications in medical devices.

**KEYWORDS:** Vaginal Drug Delivery System, Sustained Release, Natural Rubber Latex, Liposome, Nanoencapsulation.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Modelo conceitual do papel da integração entre DMG, IU-EG e Miopia Hiperglicêmica Gestacional como uma nova tríade na determinação da prevalência de IU materna de longo prazo.....	23
<b>Figura 2.</b> Detalhe para o relaxamento e contração na fibra muscular (A e B, respectivamente) e nos músculos do assoalho pélvico (C e D, respectivamente). ...	25
<b>Figura 3.</b> Diagrama ilustrativo do impacto do decréscimo da CCL7 no pior prognóstico na UI.....	31
<b>Figura 4.</b> Foto da Seringueira ( <i>Hevea brasiliensis</i> ) com os cortes em seu tronco e recipiente de coleta da seiva posicionado. ....	35
<b>Figura 5.</b> Extração do LN e composição da partícula da borracha natural: (A) representa o corte realizado no córtex da seringueira para a coleta do LN; (B) traz as fases após processo de centrifugação do material pós-extração com três fases distintas do LN (partículas de borracha (rubber particles), c-serum e b-serum; (C) representa a fórmula estrutural do poli-cis-1,4-isopreno com as extremidades terminais e (D) representa a partícula de borracha da fase menos densa composta de proteínas, fosfolídeos e o poli-cis-1,4-isopreno. ....	36
<b>Figura 6.</b> Modelo ilustrativo de dispositivo biológico baseado em LN com CTM implantado no músculo reto abdominal de rato.....	39
<b>Figura 7.</b> Diferentes tipos de perfis de liberação in vivo de droga .....	41
<b>Figura 8.</b> A estrutura do fosfolípido e de lipossomas .....	45
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática do SVLTF. (A) Estrutura cônica da Matriz de LN com Nanopartículas em sua matriz (superfície e bulk). (B) Representação dos lipossomas com a liberação de fármaco e (C) anatomia genital feminina com representação do local de inserção do dispositivo. ....	53
<b>Figura 10.</b> Preparação dos lipossomas e do dispositivo final. (A) indica os produtos usados para a preparação dos lipossomas; (B) indica o processo de ultrasonicação e encapsulação do atenolol após a preparação dos lipossomas e (C) ilustra a incorporação dos lipossomas com atenolol na matriz de LN. ....	57
<b>Figura 11.</b> Modelo conceitual das estruturas dos lipossomas estudadas.....	60

<b>Figura 12.</b> Etapas da ultrasonicação. (A) Equipamento para ultrasonicação; (B) ponta ultrasonicadora em caixa redutora de ruídos e (C) processo de ultrasonicação com banho de gelo.....	61
<b>Figura 13.</b> Esquema do protocolo de cinética de liberação. As amostras foram colocadas em membranas para diálise (A) e colocadas em água milli-Q para acompanhamento da liberação do fármaco (B), onde alíquotas foram lidas em equipamento UV-vis em intervalos específicos de tempo. O material, a cada leitura, foi repostado dentro do mesmo sistema. ....	66
<b>Figura 14.</b> Misturas contendo LN (A), LN com LPS (B) e LN com LPS-PVA (C) depositadas em lâminas. D, E e F mostram as membranas após o processo térmico de secagem, na ordem em que foram elencadas, respectivamente. ....	69
<b>Figura 15.</b> Sistema para avaliação do estiramento. (A) traz o sensor de força Xplorer GLX; (B) traz a visualização do sistema integralmente e (C) mostra uma mostra posicionada entre o sensor e o bloco móvel. ....	69
<b>Figura 16.</b> Detalhe da membrana após deposição e secagem, antes da avaliação da resistência por estiramento. ....	70
<b>Figura 17.</b> (A) Representação da curva de tensão versus deformação para diferentes corpos de prova sendo (a) comportamento frágil (b) comportamento plástico e (c) comportamento elástico. (B) traz as propriedades mecânicas principais em um ensaio de tração. ....	70
<b>Figura 18.</b> Diferenças na translucidez dos preparados após a ultrasonicação (A – à esquerda – e B) e antes (A – à direita – e C) .....	75
<b>Figura 19.</b> Tamanho de partícula e índice de polidispersão das preparações de nanopartículas. Os identificadores 59/15 e 5/10 dizem respeito aos pulsos aplicadas na ultrasonicação de cada preparação. (Teste de normalidade D'Agostino & Pearson; Tukey's post hoc para múltiplas comparações. *:p<0,05; **: p<0,006; ***: p<0,0002; ****: p<0,0001) .....	79
<b>Figura 20.</b> Potencial Zeta pulso 59/15 (s/s) .....	82
<b>Figura 21.</b> Potencial Zeta das amostras de LPS, LPS-LN e LPS-PVA com pulso de 5/10 (s/s) .....	83
<b>Figura 22.</b> Microscopia Eletrônica de Varredura das LPS-AT .....	87
<b>Figura 23.</b> Microscopia Eletrônica de Varredura das LPS-AT-LN.....	88
<b>Figura 24.</b> Microscopia Eletrônica de Varredura das LPS-AT-PVA.....	89
<b>Figura 25.</b> Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) ..	92

<b>Figura 26.</b> Espectro do Atenolol em solução aquosa (A) e absorbância em função da concentração do atenolol em solução aquosa (B).....	93
<b>Figura 27.</b> Avaliação da Cinética de Liberação do Atenolol das LPS-AT e LPS-AT-PVA .....	95
<b>Figura 28.</b> Dispositivo após processo de polimerização (A) Retirada do dispositivo do <i>eppendorf</i> (molde) e (B) foto aproximada com detalhes do dispositivo. ....	98
<b>Figura 29.</b> MEV da superfície e do bulk dos dispositivos incorporados com LPS-AT e LPS-AT-PVA .....	99
<b>Figura 30.</b> FTIR dispositivos antes e após processo de esterilização por luz-UV ..	101
<b>Figura 31.</b> Curva tensão-deformação das membranas de LN puras e com adição de nanopartículas LPS e LPS-PVA .....	103
<b>Figura 32.</b> Avaliação da Cinética de Liberação do Atenolol dos dispositivos de LN contendo LPS e LPS-PVA.....	106

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Formulação e programação de pulso de cada preparação.....	62
<b>Tabela 2.</b> Resultados individuais dos tamanhos de partícula (d.nm) e Pdl para cada preparação expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP). Os identificadores 59/15 e 5/10 dizem respeito aos pulsos aplicadas na ultrasonicação de cada preparação. ..	80
<b>Tabela 3.</b> Principais modos vibracionais do cis 1,4-poli-isopreno.....	91
<b>Tabela 4.</b> Concentrações de droga inicial, droga liberada e taxa de liberação (%) nos testes de cinética de liberação in vitro da droga das nanopartículas .....	94
<b>Tabela 5.</b> Valores de deformação até ruptura, tensão e módulo de Young para as membranas preparadas. ....	103
<b>Tabela 6.</b> Concentrações de droga inicial, droga liberada e taxa de liberação (%) nos testes de cinética de liberação in vitro da droga dos dispositivos. ....	105

## Lista de Abreviaturas

AT	Atenolol
CCL7	Proteína quimiotática de monócito 3
CTM	Células-tronco mesenquimais
DLC	Espalhamento Dinâmica de Luz
DMAP	Disfunção Muscular do Assoalho Pélvico
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
FSH	Fosfatidilcolina de soja Hidrogenada
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
IU-EG	Incontinência Urinária Específica da Gestação
LN	Látex Natural
LPS	Lipossomas livre de polímeros
LPS-AT	Lipossoma carregado com Atenolol
LPS-AT-LN	Lipossoma carregado com Atenolol e revestido com LN
LPS-AT-PVA	Lipossoma carregado com Atenolol e revestido com PVA
LPS-LN	Lipossomas revestido com LN
LPS-LN25	Lipossomas revestido com 25 $\mu$ L LN
LPS-LN50	Lipossomas revestido com 50 $\mu$ L LN
LPS-PVA	Lipossomas revestido com PVA
MAP	Músculos do assoalho pélvico
MDG	Miopatia Diabética Gestacional
MEC	Matriz extracelular
MHG	Miopatia Hiperglicêmica Gestacional
PdI	Índice de polidispersão

PVA	Álcool Polivinílico 18-88
SRP	Partículas pequenas de borracha
SUVs	Pequenos lipossomas unilamelares
SVLTF	Sistema Vaginal de Liberação Transmucosa de Fármacos
TW80	Tween 80
UI	Incontinência Urinária
UV-Vis	Ultravioleta Visível
Z-Ave	Tamanho médio de partícula

## Lista de Símbolos

$\epsilon$	deformação
$\sigma$	tensão mecânica
$E$	módulo de Young

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
1.1.	Diabetes <i>Mellitus</i> Gestacional e sua interação com a funcionabilidade muscular	22
1.2.	Impacto da MDG e IU na qualidade de vida da mulher e saúde pública	25
1.3.	Abordagens terapêuticas para regeneração muscular esquelética	27
1.4.	Os Polímeros e Biocompatibilidade	32
1.5.	O Látex Natural: extração, composição e coagulação	34
1.6.	Dispositivos Biológicos para Regeneração Muscular	37
1.7.	Sistemas de Entrega de Drogas	40
1.8.	Nanotecnologia	43
1.9.	Lipossomas	44
1.10.	Distribuição transmucosa medicamentos	47
1.11.	Aspectos Econômicos	48
1.12.	Desafios para o desenvolvimento do dispositivo	50
<b>2</b>	<b>MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS</b>	<b>52</b>
2	Motivação e Objetivos	53
2.1.	Objetivo Geral	54
2.2.	Objetivos Específicos	54
<b>3</b>	<b>MATERIAL E METODOLOGIA</b>	<b>55</b>
3.1.	Obtenção do Látex Natural	58
3.2.	Preparação dos Lipossomas	58
3.2.1	Materiais utilizados	58

3.2.2. Síntese dos lipossomas por ultrasonização .....	58
3.3. Encapsulação do fármaco .....	62
3.4. Caracterização dos lipossomas .....	62
3.4.1. Morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura .....	62
3.4.2. Tamanho de Partícula e Potencial Zeta .....	63
3.4.3. Análise de interações químicas dos preparados por FTIR .....	64
3.4.4. Cinética de Liberação do Atenolol dos lipossomas .....	65
3.5. O dispositivo SVLTF .....	66
3.5.1. Preparação do SVLTF .....	66
3.5.2. Morfologia da superfície e <i>bulk</i> por Microscopia Eletrônica de Varredura .....	67
3.5.3. Estudo das interações químicas antes e após luz-UV .....	67
3.5.4. Resistência Mecânica de membranas contendo LPS-AT e LPS-AT-PVA .....	68
3.5.5. Cinética de Liberação do Atenolol do SVLTF .....	71
3.6. Análise estatística e visualização de dados .....	72
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
4.1. Caracterização dos lipossomas .....	74
4.1.1. Aspectos das preparações pós-ultrasonicação .....	74
4.1.2. Diâmetro de partícula e Pdl .....	75
4.1.3. Potencial Zeta .....	81
4.1.4. Morfologia dos lipossomas .....	84
4.1.5 Análises das interações químicas por FTIR .....	89
4.1.6. Cinética de Liberação do Atenolol das nanopartículas .....	93
4.2. Caracterização dos Dispositivos .....	96
4.2.1 Morfologia da superfície e do <i>bulk</i> dos dispositivos .....	98
4.2.2 Integridade das ligações químicas do dispositivo e análise da influência da Luz-UV ..	100
4.2.3 Resistência Mecânica .....	101
4.2.4. Cinética de Liberação do Atenolol do dispositivo .....	104
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>110</b>

**CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS ..... 122**

Artigos Publicados.....123

Artigos Publicados como *Diamater Study Group* .....124

Resumos publicados em anais de congressos .....126

Apresentações de Trabalho.....127

# 1 Introdução

## 1 Introdução

### 1.1. Diabetes *Mellitus* Gestacional e sua interação com a funcionalidade muscular

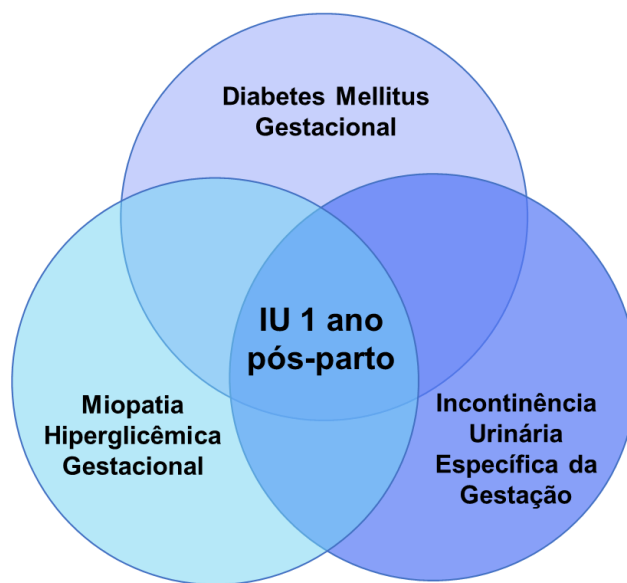
O Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) é uma condição médica caracterizada pela resistência à insulina e/ou incapacidade de secreção da insulina diagnosticada pela primeira vez durante a gestação (AD ASSOCIATION., 2022). O desbalanço da insulina leva a uma inflamação vascular e predisposição ao risco de desenvolver patologias mais severas, como a diabetes *mellitus* tipo 2 (BELLAMY *et al.*, 2009) e doenças cardiovasculares, nas mães ou em seus descendentes, após uma gestação complicada pelo DMG (FLORIANO *et al.*, 2020; RETNAKARAN, 2018).

Esta doença metabólica que associada a incidência de Incontinência Urinária Específica da Gestação (IU-EG) contribui para o desenvolvimento de Incontinência Urinária (UI) e Disfunção Muscular do Assoalho Pélvico (DMAP) até 2 anos pós-parto cesárea (BARBOSA *et al.*, 2011; RUDGE *et al.*, 2020). Além disso, o DMG está relacionado ao comprometimento da força do músculo e sua funcionalidade, havendo uma relação entre seu diagnóstico, a fraqueza muscular e outras complicações (BARBOSA *et al.*, 2011).

Estudos translacionais utilizando ratas prenhes em modelo experimental de DMG revelaram alterações musculares semelhantes às observadas em humanos, caracterizadas como "miopatia diabética", que resulta em grave atrofia muscular. Essas alterações incluem a desorganização e ruptura das fibras musculares, co-localização de fibras rápidas e lentas, diminuição da proporção de fibras rápidas, aumento de tecido conjuntivo entre as fibras musculares estriadas e aumento da razão de Colágeno tipo I/ Tipo III, indicando uma matriz extracelular (MEC) mais rígida, prejudicando o fechamento uretral (MARINI *et al.*, 2011).

Estes resultados corroboraram com resultados clínicos obtidos por nosso grupo de pesquisa, de que DMG com IU-EG estão associadas à DMAP, Miopatia Diabética Gestacional (MDG) e IU a longo-prazo (BARBOSA *et al.*, 2011; RUDGE *et al.*, 2020), como sugere o modelo conceitual na Figura 1.

**Figura 1.** Modelo conceitual do papel da integração entre DMG, IU-EG e Miopatia Hiperglicêmica Gestacional como uma nova tríade na determinação da prevalência de IU materna de longo prazo



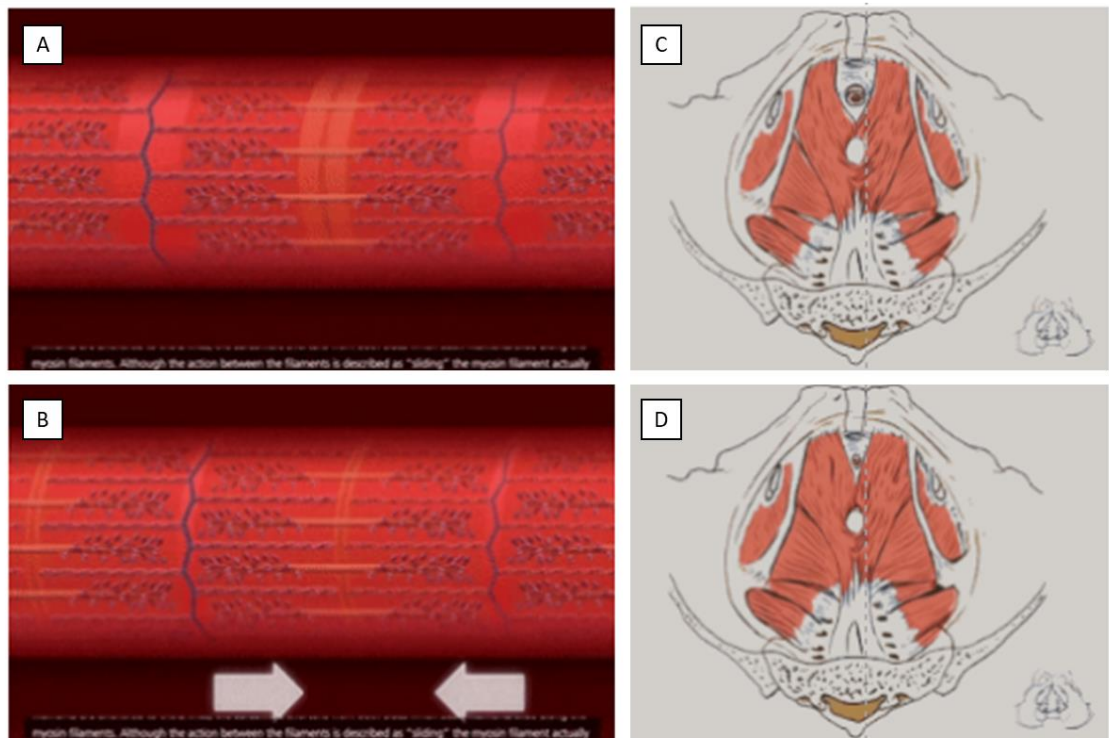
**Fonte:** adaptado de Rudge *et al.* (2020) pelo autor.

O diabetes mellitus e o DMG podem causar a miopatia diabética e MDG, as quais lesam o músculo esquelético levando a atrofia decorrente da neuropatia diabética ou por efeito direto sobre o metabolismo das células musculares pelo alto teor de glicose e baixo de insulina (SUN, 2008). A insulina é fator fundamental na manutenção da proteína do músculo esquelético e a perda de massa muscular no diabetes decorre de danos nas vias de sinalização intracelular envolvidos na manutenção e no equilíbrio entre a degradação e a síntese da proteína nova que

depende da fosforilação e da expressão de novas proteínas reguladoras específicas (JELLINGER, 2009).

Além disso, durante a gestação algumas alterações no tecido conjuntivo inerentes às alterações hormonais relacionadas ao hormônio relaxina que ainda são pouco conhecidas no DMG (ALDABE *et al.*, 2012) podem contribuir para a piora do quadro de MDG, atrofia muscular e IU. Paralelamente, também existem alterações musculares (D'SOUZA; AL-SAJEE; HAWKE, 2013) resultantes, direta e/ou indiretamente dos níveis de CCL7 (proteína quimiotática de monócito 3), relaxina, insulina, glicose, paratormônio (PTH), cálcio (Ca), calcitonina e vitamina D (ASEMI; KARAMALI; ESMAILZADEH, 2014; KARAMALI *et al.*, 2016). Estas alterações funcionais, bioquímicas (relaxina, CCL7, insulina, glicose, PTH, Ca, calcitonina e vitamina D) e estruturais no músculo esquelético diminuem a capacidade funcional e acarretam fraqueza muscular; diminuição nas mitocôndrias e transformações nas fibras musculares (JIANG *et al.*, 2013; RAMCHURN *et al.*, 2009) piorando drasticamente os efeitos da MDG. Na Figura 2 é possível identificar o funcionamento normal da contração das fibras musculares e dos músculos do assoalho pélvico.

**Figura 2.** Detalhe para o relaxamento e contração na fibra muscular (A e B, respectivamente) e nos músculos do assoalho pélvico (C e D, respectivamente)



(Fonte: youtube.com - Muscle contraction detail Concept Cell Biology e pelvicarehabilitation.com).

É consenso na literatura que a MDG, atrofia muscular do assoalho pélvico e a IU tem impacto negativo na qualidade de vida, afetando a vida sexual, higiene íntima, autoestima e atividades diárias (FARIA *et al.*, 2015; MLADENOVIC-SEGEDI *et al.*, 2011).

## 1.2. Impacto da MDG e IU na qualidade de vida da mulher e saúde pública

De acordo com dados atuais do ministério da saúde, a IU na mulher eleva os custos em saúde pública, uma vez que seu tratamento é pouco efetivo e ocorre geralmente por meio de cirúrgicas, isto acarreta grande número de cirurgias eletivas que são realizadas para restaurar a continência urinária nestas pacientes, que tem pouca taxa de sucesso e muitas vezes necessitam de novas correções cirúrgicas.

Sabe-se que a IU gera enorme custo ao sistema único de saúde (SUS), mas este custo real ainda é subnotificado (ALVARENGA-MARTINS *et al.*, 2017). Os gastos são elevados não apenas ao sistema único de saúde, mas também para a própria paciente e sua família, se forem analisados os gastos médios com absorventes íntimos, higiene pessoal e higiene de roupas (ARAÚJO, 2009).

As consequências no âmbito físico, psicológico, emocional e social devem ser consideradas. Muitas mulheres tendem a deixar o mercado de trabalho por vergonha, com a IU há uma dificuldade em trabalhar e realizar as atividades diárias, impactando-as psicologicamente com gatilhos, estresse, diminuição da autoestima, alterações de humor e possivelmente depressão (MAZUR-BIALY *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2019). As dificuldades nos relacionamentos também é relatada, devido a disfunções sexuais que possam afetá-las (PREDA; MOREIRA, 2019). Estudos relataram que pacientes diagnosticadas com DMG podem ter a vida sexual impactada negativamente (NUNES *et al.*, 2020). Há relatos que a perda de urina pode ocorrer com a penetração e estar relacionada à redução da ocorrência de orgasmos, a diminuição da frequência de atividade sexual; diminuição do desejo, da excitação e lubrificação (BRUBAKER *et al.*, 2009; PREDA; MOREIRA, 2019).

Atualmente, não existe medicamentos, terapias efetivas ou profilaxia da IU. O tratamento primariamente recomendado para pacientes que apresentam a perda de urina são treinamentos pélvicos, entretanto muitas mulheres não são capazes de realizar as contrações do assoalho pélvico instruídas pelo profissional (MAZUR-BIALY *et al.*, 2020), além disso, trata-se de um tratamento paliativo. A eletroestimulação é outra ferramenta frequentemente utilizada, porém pacientes podem experimentar dor e desconforto (MAZUR-BIALY *et al.*, 2020), enquanto que as intervenções cirúrgicas

aumentam o risco de complicações para a paciente e podem não ser efetivas (HAN *et al.*, 2022).

Ainda, dados recentes, indicam que com a Pandemia do COVID-19, houve redução dos tratamentos cirúrgicos não emergenciais, devido aos critérios adotadas para cirurgias eletivas (JORGE *et al.*, 2022), bem como queda no número de atendimentos e consultas, que, embora ainda não avaliado, pode impactar na saúde de pacientes (SILVA; MOROÇO; CARNEIRO, 2021).

O dispositivo proposto abre precedentes para que intervenções eficientes não só para o tratamento, mas também para a profilaxia, oferecem a pacientes com maiores riscos de desenvolver a IU, ou que já foram diagnosticadas, a liberdade de lidar com a IU em sua própria casa, sem a necessidade de depender da disponibilidade de consultas.

O tópico a seguir elenca e detalha propostas de intervenções e suas vantagens e desvantagens no tratamento da IU.

### **1.3. Abordagens terapêuticas para regeneração muscular esquelética**

Na gestação, há grande limitação para pesquisa clínica com novos medicamentos e terapias devido aos possíveis efeitos deletérios e riscos teratogênicos sobre a mãe e o concepto (MCKIEVER; FREY; COSTANTINE, 2020).

Atualmente, as propostas de tratamento para a regeneração muscular incluem intervenções cirúrgicas com enxerto autólogo, fisioterapia e utilização de andaimes (*scaffolds*) biológicos (LIU *et al.*, 2018). Intervenções cirúrgicas são indicadas para casos com perdas consideráveis de musculatura e danos severos, sendo realizado o transplante de enxerto saudável. Entretanto, ainda que o músculo seja funcional, pode

haver resultados indesejados, tais como morbidade e inervação inadequada (LIU *et al.*, 2018; NGAN *et al.*, 2018).

A fisioterapia é uma intervenção paliativa não invasiva indicada para reabilitação em caso de ferimentos ou para tratamento de perda crônica de musculatura. Embora traga inúmeros benefícios como a modulação da resposta imune e liberação de fatores que promovam a vascularização e recuperação do tecido, o tratamento é menos eficaz em regiões com perda considerável de volume muscular (LIU *et al.*, 2018).

Atualmente, o campo da medicina regenerativa tem devotado seus esforços na regeneração tecidual, incluindo o músculo esquelético, por meio de andaimes biológicos associados a proteínas da matriz extracelular, metodologia que demonstra grande potencial terapêutico para reconstrução e regeneração tecidual, promovendo o reparo da musculatura esquelética. Estes andaimes fornecem estrutura bioquímica que facilita a remodelação do tecido pelo estímulo da proliferação celular e reorganização da citoarquitetura tecidual (COSTA *et al.*, 2017). Entretanto, esta metodologia pode causar respostas imunes e riscos potenciais de infecção (BILODEAU *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2018).

Outras estratégias envolvendo engenharia de tecidos e andaimes contendo CTM (Células-tronco mesenquimais) estão atualmente sendo investigadas (DUNN *et al.*, 2019; QIU *et al.*, 2018). As CTM são células multipotentes capazes de se diferenciarem em linhagens celulares adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas sob a influência de variados fatores biológicos (DOMINICI *et al.*, 2006) e que contribuem para a regeneração tecidual e recuperação funcional em condições clínicas (BEHNKE *et al.*, 2020). A aplicação de engenharia de tecidos e de andaimes têm finalidade de superar os desafios da terapia com CTM, tornando-a mais segura e

efetiva. As recentes descobertas e o avanço científico tecnológico no desenvolvimento de novos materiais, bem como o maior conhecimento dos processos biológicos, tem contribuído enormemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Terapias com CTM estão entre as mais novas estratégias de investigação para o tratamento e prevenção da IU-EG, podendo-se citar o dispositivo a partir de LN desenvolvido por Floriano *et al.* (2019). No entanto, os mecanismos subjacentes à migração das CTM não estão totalmente claros. Os receptores de quimiocinas, seus ligantes e moléculas de adesão desempenham papel importante no recrutamento (ou *homing*) específico dos leucócitos no tecido e também foram implicados no tráfico de precursores hematopoiéticos para dentro e através do tecido. Vários estudos relataram a expressão funcional de vários receptores de quimiocinas e moléculas de adesão em células-tronco humanas. O aproveitamento do potencial migratório das células-tronco por meio da modulação de suas interações entre receptores de quimiocinas pode ser maneira poderosa de aumentar sua capacidade de corrigir distúrbios dos tecidos mesenquimais ou facilitar o reparo tecidual (LI *et al.*, 2017; ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015). Além disso, CTM expandidas *ex vivo* têm sido pedra angular de bioterapêuticos e têm atraído cada vez mais atenção para o tratamento de doenças intratáveis, além de melhorar a regeneração dos tecidos.

Todavia, a utilização de materiais celulares exógenos para desenvolver tratamentos restauradores para grande número de pacientes tornou-se grande preocupação, tanto por motivos econômicos, quanto de segurança (PÄTH *et al.*, 2019). Algumas limitações destacam-se, tais como: a migração de células-tronco para diferentes locais da região específica a ser tratada; tratamentos por meio de infusão venosa de CTM permitem que apenas pequenas quantidades de células atinjam a região a ser tratada (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007; ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015);

a redução da capacidade regenerativa das células cultivadas foi observada, assim como reações imunes (DUNN *et al.*, 2019) e riscos tumorigênicos (PÄTH *et al.*, 2019).

Estudos demonstraram que metodologias para estimulação da angiogênese, fenômeno importante no processo de regeneração e reparo tecidual, tem sido ferramenta chave para terapias eficientes (Floriano *et al.*, 2022).

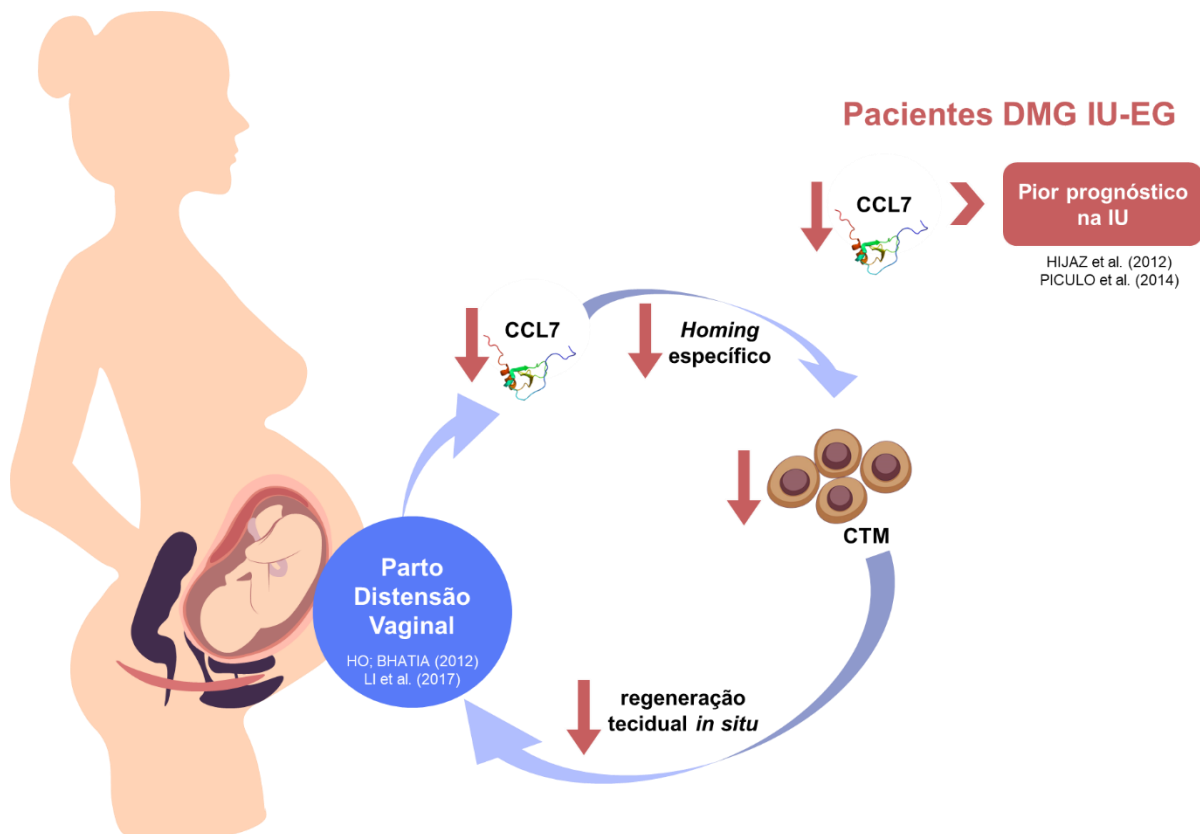
A administração artificial de quimiocinas específicas como sinais sistemicamente ou no local da lesão, tipicamente usando biomateriais, é estratégia de ponta que potencializa o direcionamento de CTM e recria microambiente anti-inflamatório e imunomodulador para melhorar o *homing* celular levando a regeneração tecidual *in situ*, tornando este tipo de terapia mais segura (LI *et al.*, 2017).

Desta forma, com base em fatores de grande importância, a migração das CTM para os músculos do assoalho pélvico (MAP) logo após o parto, a qual é mediada por fatores endógenos, como a concentração de CCL7 induzida por lesão muscular causada por distensão vaginal (HO; BHATIA, 2012), permitem o vislumbre de uma nova abordagem arrojada para a terapia da MDG. Além disso, alguns estudos já demonstraram que a infusão intravenosa de CTM em ratos foi associada à recuperação funcional acelerada da perda de resistência uretral (DISSARANAN *et al.*, 2014; RAMOS-CABRER *et al.*, 2010), sugerindo que a promoção da mobilização dessas células pode ter efeito positivo na recuperação da IU. Verificou-se que a migração de células-tronco endógenas em ratos também facilita a reparação tecidual da distensão vaginal (LENIS *et al.*, 2013).

Nosso grupo de pesquisa identificou que algumas mulheres apresentam decréscimo na expressão da proteína quimiotática de monócito 3, também chamada de CCL7 ou ligante de quimiocina 7. A CCL7 é importante quimiocina envolvida no

recrutamento de células-tronco para os MAP logo após a lesão de distensão pós-parto, e este decréscimo foi importante fator associado ao pior prognóstico na IU (HIJAZ *et al.*, 2013; PICULO *et al.*, 2014). A Figura 3 ilustra didaticamente o impacto desse decréscimo das concentrações de CCL7.

**Figura 3.** Diagrama ilustrativo do impacto do decréscimo da CCL7 no pior prognóstico na UI



**Fonte:** ilustração elaborada pelo autor a partir de estudos de HIJAZ *et al.* (2012) e PICULO *et al.* (2014).

Portanto, a liberação sustentada da quimiocina CCL7 fornece grande perspectiva para o posicionamento homogêneo de células-tronco endógenas e melhora na resposta à terapia com CTM exógenas na regeneração muscular do assoalho pélvico (RIVERA-DELGADO *et al.*, 2016). Os polímeros naturais podem fornecer alternativas vantajosas para a entrega de quimiocinas e outros agentes

terapêuticos localmente na musculatura do assoalho pélvico das mulheres acometidas pela IU, principalmente os polímeros biocompatíveis e que apresentem porosidade, importante fator para a liberação de drogas.

#### **1.4. Os Polímeros e Biocompatibilidade**

Polímeros – do grego “*poly*” (muitos) e “*mero*” (partes ou unidades) – são macromoléculas compostas pela repetição de unidades estruturais menores usualmente chamadas monômeros. Essas unidades monoméricas se ligam entre si por meio de ligações químicas covalentes, formando uma cadeia longa e contínua. (CALLISTER; RETHWISCH, 2018; OLATUNJI, 2016).

O processo de ligação dos monômeros é chamado de polimerização. A ligação química entre os monômeros em um polímero é chamada de ligação covalente, formando uma interação forte e estável entre pares de elétrons de átomos. Por se tratarem de macromoléculas com alta massa molecular, ocorre na polimerização a formação de cadeias com distribuição de tamanhos diferentes, assim, normalmente, uma média para a massa molecular é especificada (CALLISTER; RETHWISCH, 2018).

Os polímeros são materiais extremamente versáteis que podem ser utilizados na indústria cosmética ou farmacêutica em sistemas de entrega de drogas, devido a suas características físico químicas, tais como massa molecular, cristalinidade, polidispersão, propriedades térmicas e propriedades mecânicas. Por serem altamente estudados, podem ser atrativos para o desenvolvimento de biomateriais biocompatíveis (PORTO, 2012).

Os biomateriais são aqueles que apresentam uma interação adequada com os sistemas biológicos, como células, tecidos e órgãos, sem causar efeitos adversos

significativos. Esses materiais são amplamente utilizados na área médica e biomédica devido à sua capacidade de serem compatíveis com o corpo humano e de desempenharem funções específicas no contexto biológico (RATNER *et al.*, 2012).

A definição do termo biocompatibilidade é amplamente discutida. Os aspectos que tornam um material biocompatível podem incluir: sua não-toxicidade, ou seja, eles devem ser não tóxicos e não causar reações imunológicas adversas quando em contato com o tecido vivo; ser não-carcinogênico; ser estável e ser possível o controle de sua degradação, permitindo uma resposta biológica controlada; ter propriedades mecânicas adequadas para suportar as demandas físicas do ambiente biológico. (PAPPALARDO; MATHISEN; FINNE-WISTRAND, 2019)

Antigamente, acreditava-se que um material biocompatível precisava ser quimicamente não-reativo, ou seja, não deveria haver reações químicas entre o material e o tecido alvo, entretanto, esta definição foi redefinida, uma vez que podem haver interações entre a interface biomaterial-tecido, tais como no caso dos implantes e outros dispositivos médicos. Esse conhecimento expandiu as definições de biocompatibilidade, hoje o termo é definido como a capacidade de um material realizar sua função desejada, induzindo uma resposta apropriada para uma aplicação específica (WILLIAMS, 1987), sem que haja riscos de toxicidade, rejeição imunológica ou efeitos indesejáveis (GHASEMI-MOBARAKEH *et al.*, 2019).

Os polímeros biocompatíveis são utilizados em uma variedade de aplicações biomédicas, tais como implantes médicos, dispositivos de liberação controlada de medicamentos, suturas, revestimentos de próteses, biomateriais para engenharia de tecidos, entre outros. Esses materiais podem ser projetados e modificados para se adequarem às necessidades específicas de cada aplicação, permitindo uma interação otimizada com os tecidos e células do organismo (ARIF *et al.*, 2019).

A pesquisa e o desenvolvimento contínuos nessa área têm levado ao avanço de novos polímeros biocompatíveis com propriedades aprimoradas, como maior controle da biodegradação dos polímeros, capacidade de resposta a estímulos específicos ou habilidade de promover a regeneração tecidual. Esses avanços contribuem para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras, além de melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Nesse sentido, o Látex Natural (LN) surge como um polímero natural biocompatível e com excelentes propriedades que estimulam a reparação tecidual e formação de novos vasos. Possuindo ainda a vantagem de ser utilizada como matriz para a incorporação de drogas (GUERRA *et al.*, 2021).

### **1.5. O Látex Natural: extração, composição e coagulação**

O LN é a seiva leitosa extraída da árvore conhecida popularmente como Seringueira (*Hevea brasiliensis*), natural da região da bacia Amazônica. A extração do LN, processo chamado de sangria, ocorre por meio de um corte (Figura 4A) realizada em seu tronco no qual se encontram os vasos laticíferos e coletado em recipientes (Figura 4B) nas primeiras horas da manhã (MORAWETZ, 2000).

Para o processo de sangria, os cortes (Figura 5A) ao redor do tronco devem ser realizados com profundidade de 1 cm (GUERRA *et al.*, 2021). Quando centrifugado, sua primeira fase é constituída de partículas de borracha natural com coloração esbranquiçada, sua segunda fase compreende substâncias solúveis advindas do citoplasma das células vegetais, chamadas de Soro C e sua última fase constitui-se de substâncias lutóides e compressos Frey-Wyssling (Figura 5B). A cadeia polimérica é formada por milhares de unidades poli(cis-1,4-isopreno), duas unidades de trans-1,4-isopreno e dois grupos terminais de cadeias  $\alpha$  e  $\omega$  (Figura 5C). O material extraído consiste em mistura de partículas de borracha coloidal estabilizada

por fina camada de fosfolipídios e proteínas, com composição de 40-45% de borracha (poli-cis-1,4-isopreno), 4-5% de constituintes tais como proteínas, lipídios, carboidratos e açúcar e 50% de água (Figura 5D) (GUERRA *et al.*, 2021; AGOSTINI, 2009).

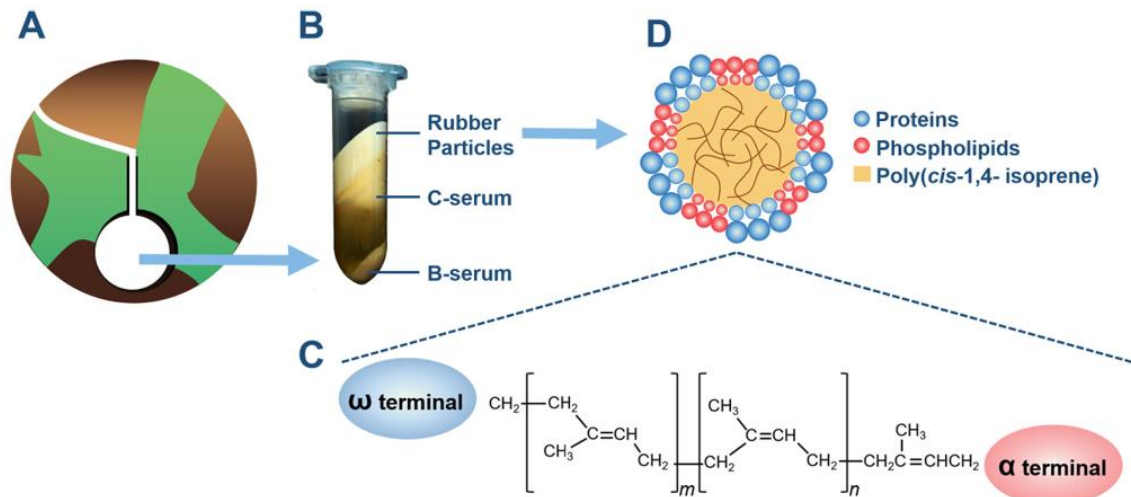
As partículas de borracha possuem um padrão de distribuição de diâmetros com dois modos distintos. Elas podem ser classificadas de acordo com o tamanho em duas categorias: partículas pequenas de borracha (SRP) com um tamanho médio de 10 a 250 nm, e partículas grandes de borracha (LRP) com um tamanho médio de 250 a 3000 nm (RAFAŁ KĘDZIA *et al.*, 2023).

**Figura 4.** Foto da Seringueira (*Hevea brasiliensis*) com os cortes em seu tronco e recipiente de coleta da seiva posicionado



**Fonte:** Imagens de Rungthip J. (esquerda) e Nguyen Si (direita) por Pixabay.

**Figura 5.** Extração do LN e composição da partícula da borracha natural: (A) representa o corte realizado no córtex da seringueira para a coleta do LN; (B) traz as fases após processo de centrifugação do material pós-extração com três fases distintas do LN (partículas de borracha (rubber particles), c-serum e b-serum); (C) representa a fórmula estrutural do poli-cis-1,4-isopreno com as extremidades terminais e (D) representa a partícula de borracha da fase menos densa composta de proteínas, fosfolípidos e o poli-cis-1,4-isopreno



Fonte: Guerra *et al.* (2021).

A coagulação é um processo natural do LN que dificulta seu processamento e utilização. Para evitar isso, uma das estratégias é a adição de aditivos químicos, sendo a amônia a mais utilizada, assim a amônia possui um papel fundamental na prevenção da coagulação do LN. Quando adicionada ao LN, ela atua como um agente biocida, agindo também como um alcalinizante, aumentando a carga negativa nas partículas de borracha, o que contribui para a estabilidade da suspensão coloidal, impedindo a coagulação prematura das partículas de borracha. (NG; OTHMAN; YUSOF, 2022; RAFAŁ KĘDZIA *et al.*, 2023). A amônia também possui propriedades tampão, regulando o pH do LN e neutralizando ácidos livres que possam se formar durante o processo. Além disso, ela reduz a viscosidade do LN, tornando-o mais fluido e facilitando seu manuseio em diversas aplicações industriais (RAFAŁ KĘDZIA *et al.*, 2023).

O LN demonstrou excelentes características para sua seleção como material a ser adotado dentro deste estudo. Dentre suas vantagens, destaca-se a sua capacidade de estimular a angiogênese (FLORIANO *et al.*, 2014; HERCULANO *et al.*, 2009), estabilidade e flexibilidade, baixo custo, abundância (ERENO *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2009; FLORIANO *et al.*, 2014), sustentabilidade por ser proveniente de fonte renovável (SILVA *et al.*, 2021), resistência à tração, elasticidade e adesividade (SIMCHAREON *et al.*, 2012), permeabilidade (SIVASANKARAPILLAI *et al.*, 2021), facilidade em produção em larga escala e estudos que demonstram sua capacidade de realizar a entrega de fármacos de forma sustentada (FLORIANO *et al.*, 2018).

### **1.6. Dispositivos Biológicos para Regeneração Muscular**

O potencial das membranas LN usadas como sistema de liberação de drogas tem sido demonstrado em alguns estudos, como na liberação de peptídeos de interesse farmacológico em estudo usando ocitocina, diclofenaco e cetoprofeno em sistema de liberação transdérmica de drogas (BARROS *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2016; Floriano *et al.*, 2018). Ainda, o LN tem se mostrado uma excelente matriz sólida para a incorporação de componentes terapêuticos com o intuito de obter uma liberação sustentada e no local da injúria (GUERRA *et al.*, 2021).

O desenvolvimento de Sistema Vaginal de Liberação Transmucosa de Fármacos (SVLTF) tem se intensificado, e o foco tem sido no desenvolvimento de sistemas de liberação que proporcionam terapêutica de longo prazo que mantém concentração adequada de medicamentos (ROSSI *et al.*, 2012). O SVLTF oferece vantagens distintas para o fornecimento sistêmico e local de medicamentos. Essas vantagens incluem possível desvio do metabolismo de primeira passagem, evitando distúrbios gastrintestinais, grande área de superfície de contato, rico suprimento

sanguíneo, permeabilidade relativamente alta a muitos fármacos e auto inserção, tornando a mucosa vaginal local potencial para administração local e sistêmica de medicamentos (KUMAR ROY; PRABHAKAR, 2010).

Recentemente, os biopolímeros têm sido muito utilizados na fabricação de sistemas de liberação de fármacos transmucosos, devido à sua excelente biocompatibilidade e características físico-químicas (DEEPAK; GOYAL; RATH, 2018; GOYCOOLEA *et al.*, 2009). Particularmente, o LN é excelente candidato para a produção de dispositivos biológicos, não só por sua biocompatibilidade e bioatividade, mas também por sua flexibilidade, estabilidade mecânica, porosidade superficial e permeabilidade, além de baixo custo e abundância (ERENO *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2009; FLORIANO *et al.*, 2014).

Sua bioatividade é devido à presença de proteínas pró-angiogênicas na parte líquida do LN. Essas proteínas são liberadas de maneira controlada devido às estruturas formadas pelo poli-cis-1,4-isopreno após o processo de polimerização. Essa liberação sustentada das proteínas é crucial para o potencial pró-angiogênico do LN, o que o torna uma excelente opção para o desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos eficientes (FLORIANO *et al.*, 2022).

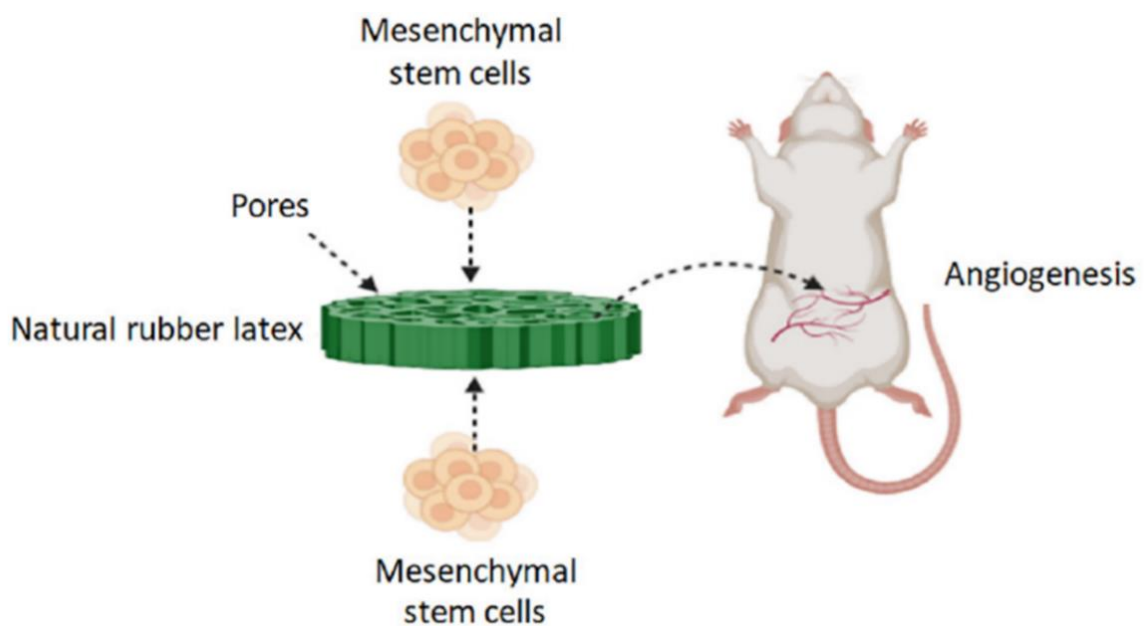
Floriano *et al.* (2014) conduziu estudos de biocompatibilidade em conformidade com as normas éticas e sanitárias vigentes, os quais confirmaram a segurança do uso do LN de diferentes clones produzidos no Brasil como biomaterial.

Um biodispositivo desenvolvido dentro do Projeto Temático DIAMATER (Processo Fapesp: 2016/01743-5) para a regeneração do músculo esquelético foi recentemente proposto para mulheres com DMG (patente número BR 102020 0055364)(FLORIANO *et al.*, 2019). O biodispositivo foi projetado utilizando uma

membrana porosa de LN com CTM, o qual foi testada em modelo experimental de MDG (Figura 6) e apresentou resultados preliminares satisfatórios e positivos quanto a neovascularização e resposta pró-inflamatória, exibindo espessamento do músculo esquelético do MRA de ratos com MDG em comparação com ratos não-MDG, além da recuperação da funcionalidade contrátil muscular.

Desta forma, consideramos o LN material ideal para ser utilizado como sistema de liberação sustentado de bioativos, como a proteína CCL7, em tratamento inédito para a regeneração dos MAP, e que poderá promover a recuperação da IU-EG. O dispositivo desenvolvido dentro do Grupo Temático Diamater trouxe grandes perspectivas com relação a esse modelo de intervenção clínica, trazendo grandes resultados benéficos, mas que podem ter seus efeitos melhorados com o uso de novas ferramentas como a nanotecnologia e engenharia de materiais. Esta nova terapia será ainda de baixíssimo custo, de aplicação confortável e não invasiva.

**Figura 6.** Modelo ilustrativo de dispositivo biológico baseado em LN com CTM implantado no músculo reto abdominal de rato



**Fonte:** (Floriano *et al.*,2022).

### 1.7. Sistemas de Entrega de Drogas

Os sistemas de entrega de drogas se referem a abordagens e tecnologias com o intuito de transportar agentes terapêuticos no organismo de forma segura e eficiente para atingir os efeitos desejados (LIU *et al.*, 2016). Isso envolve o desenvolvimento e a implementação de sistemas que controlam a liberação, distribuição e direcionamento de drogas para alcançar resultados terapêuticos ideais.

Os sistemas convencionais podem apresentar efeitos sistêmicos adversos por conta de sua biodistribuição não-específica e não controlada do fármaco, além disso, a eliminação do fármaco pode ocorrer de uma forma rápida e a dose pode não ser adequadamente mantida dentro da janela terapêutica (ADEPU; RAMAKRISHNA, 2021).

Os sistemas de liberação controlada de drogas referem-se a tecnologias que oferecem controle sobre a liberação de drogas no corpo, permitindo controlar a concentração da droga na área alvo e manter o nível adequados da droga no organismo (SIEPMANN; SIEPMANN, 2012), trazendo maior eficiência na terapia, redução da frequência de administração de doses (LIU *et al.*, 2016) e redução de efeitos tóxicos ou colaterais, os quais são decorrentes de uma biodistribuição inespecífica (LIU *et al.*, 2016; PARK, 2014).

Existem diversos modelos de cinética de liberação de fármacos. A Figura 7 ilustra diferentes formas de liberação. comparativamente com o modelo de liberação convencional e liberações rápida (também referido como *burst release*, no inglês).

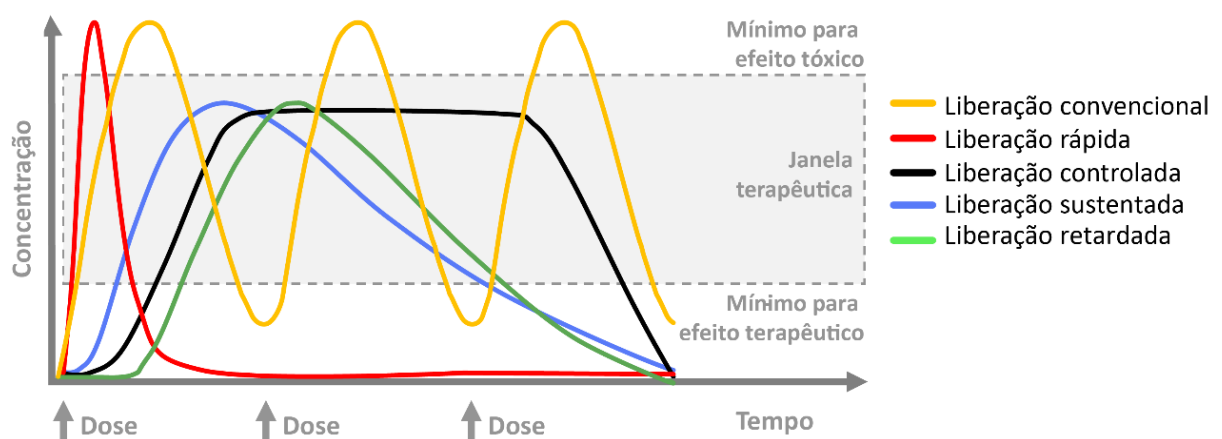
As definições para os sistemas de liberação sustentada e controlada podem se confundir na literatura. A liberação sustentada (linha azul, na Figura 7) foi definida como um sistema projetado para alcançar uma liberação lenta de um medicamento

ao longo de um período estendido após a administração de uma única dose (ADEPU; RAMAKRISHNA, 2021). A necessidade de desenvolver sistemas de liberação sustentada baseia-se na prolongação da duração do efeito do medicamento, redução da frequência de dosagem; minimização das flutuações no nível do medicamento no plasma e redução de efeitos adversos (JAIN, 2020).

A liberação controlada (linha preta, na Figura 7) envolve a regulação da entrega de um fármaco, geralmente por meio de um dispositivo. Esse controle visa fornecer o medicamento em uma taxa específica por um período determinado, independente das condições locais. Os prazos de entrega são geralmente muito mais longos em comparação com a liberação sustentada, variando de dias a anos. A liberação controlada também pode incluir métodos para direcionar a droga para um local específico de ação. Os termos "sistemas de entrega específicos" e "direcionados ao local" são usados para descrever esse tipo de controle (JAIN, 2020).

O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos envolve pesquisa interdisciplinar, combinando conhecimentos de áreas como farmacologia, química, ciência dos materiais, engenharia e nanotecnologia.

**Figura 7.** Diferentes tipos de perfis de liberação *in vivo* de droga



**Fonte:** adaptado de Boostani (2020) e Guerra *et al.* (2021).

Embora as características físico-químicas do LN permitam a liberação sustentada de fármaco adequada, esta liberação não é totalmente controlada. Sabemos que a cinética de liberação de fármaco, utilizando o LN como matriz polimérica, segue o padrão de liberação rápida ou de rajada nas primeiras horas (Figura 7, linha vermelha), seguida de liberação mais lenta. A liberação rápida nas primeiras horas é devida à aos aglomerados de fármaco que se formam na superfície da membrana de LN. Posteriormente, devido ao processo de absorção de água, o fármaco mais interno ao *bulk* (interior) da membrana é liberado por meio de processos de difusão e por meio de fraturas ou defeitos na superfície da membrana de LN (FLORIANO *et al.*, 2018).

Estudos têm demonstrado que a liberação rápida inicial pode provocar o esgotamento do fármaco contido no dispositivo, entretanto pode ser utilizada em alguns casos como parte do tratamento para um rápido efeito e tratamento inicial, seguindo da liberação sustentada (Figura 7, linha azul) com promoção gradual da recuperação/regeneração (CAM *et al.*, 2020). Sendo interessante ainda a redução da liberação rápida e mais recomendado a utilização de intervenções com liberação sustentada ou controlada (Figura 7, linha preta) ou retardada (Figura 7, linha verde) (BOOSTANI; JAFARI, 2020).

Matrizes de polímero hidrofílico são amplamente utilizadas para formular uma forma de liberação sustentada (RATNAPARKHI; GUPTA JYOTI, 2013), devido ao impacto de sua morfologia e flexibilidade no perfil de liberação de drogas (KORSMEYER; PEPPAS, 1981), custo-eficácia e ampla aceitação regulatória (PATEL *et al.*, 2011). Os métodos de entrega de droga evoluíram continuamente, bem como suas formulações, sendo reportado a utilização de novos transportadores de drogas tais como carreadores poliméricos, colágeno, microesferas, métodos baseados em

nanobiotecnologia (incluindo nanopartículas como lipossomas, nanopartículas sólidas lipídicas, micro e nano-emulsões, micro e nanocápsulas), sistemas direcionados a anticorpos: anticorpos radiomarcados (JAIN, 2020), entre outros.

O LN demonstra grande potencial para a construção de sistemas de entrega sustentada conforme discutido nos tópicos anteriores, entretanto é necessária sua otimização para maior controle de entrega a fim de evitar a liberação rápida nas primeiras horas conforme observado nos trabalhos de Floriano *et al.* (2018). O uso de nanotecnologia para a encapsulação de drogas pode trazer uma perspectiva segura e eficaz para o melhoramento das características do LN.

### **1.8. Nanotecnologia**

Biomateriais nanocompósitos ou bio-nanocompósitos oferecem versatilidade, por apresentarem propriedades específicas devido ao melhor controle das interações entre nanopartículas e polímeros (HULE; POCHAN, 2007). Os biomateriais nanocompósitos poliméricos possuem propriedades mecânicas superiores quando comparados com biomateriais macro e microcomposto (WINEY; VAIA, 2007). Muitos pesquisadores demonstraram que pequenas quantidades de nanopartículas adicionadas a polímeros podem alterar drasticamente as propriedades físicas do bio-nanocompósito resultante, por este motivo o uso de nanotecnologia será empregado para modificarmos a cinética de liberação do LN, a fim de obtermos maior controle da liberação da droga, otimizando a cinética de liberação do LN (PAUL; ROBESON, 2008).

Além disso, várias combinações de nanopartículas e matrizes poliméricas podem ser utilizadas para projetar combinações de propriedades anteriormente inatingíveis e pode-se escolher entre as diferentes nanopartículas, dependendo das

propriedades que precisam ser melhoradas (GAHARWAR; SCHEXNAILDER; SCHMIDT, 2012).

Estes aspectos importantes do emprego de nanotecnologia na modificação da matriz polimérica justificam o uso de nanopartículas para construir este inovador dispositivo de entrega de droga com maior controle de liberação. Nesse sentido, a nanoencapsulação tem como importante papel o fornecimento de uma alternativa potencial para se obter um dispositivo com liberação sustentada de droga. Essa otimização pode ser realizada por meio do uso de lipossomas, nanocarreadores de drogas são-tóxicos amplamente utilizados na indústria farmacêutica e cosmética (MAJA; ŽELJKO; MATEJA, 2020).

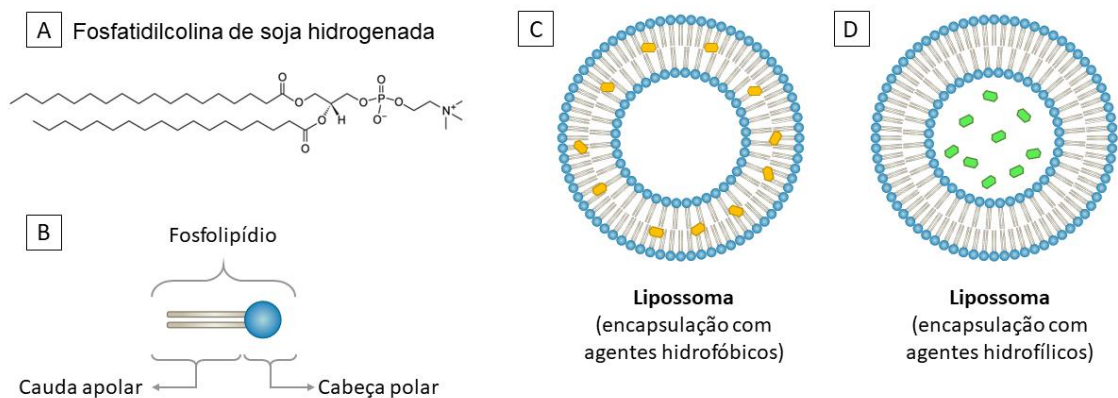
### **1.9. Lipossomas**

Lipossomas são pequenas vesículas esféricas compostas por camadas de fosfolipídios que cercam um núcleo aquoso. Podem ser formados por componentes não-tóxicos, e que se degradam naturalmente, tornando-se uma poderosa ferramenta para a entrega de diversos fármacos. Os lipossomas têm a capacidade de melhorar a eficácia terapêutica dos medicamentos, estabilizando os compostos, facilitando sua absorção pelas células e tecidos, e aumentando sua distribuição nos locais-alvo dentro do corpo, ao mesmo tempo em que reduzem a toxicidade geral do tratamento (GUIMARÃES; CAVACO-PAULO; NOGUEIRA, 2021).

Os lipossomas podendo apresentar tamanhos variados, de 10nm a 2,5µm, com valores restritos de 50nm a 450nm para aplicação em sistemas de entrega de drogas. Embora a escala nanométrica seja considerada dentro das dimensões entre 0 a 100nm, neste trabalho trazemos a palavra nanopartícula associada também em ocorrências de tamanhos até 1000nm.

A composição dos lipossomas traz principalmente fosfolipídios, uma classe de lipídio semelhante aos triglicerídeos, com uma cabeça polar (região hidrofílica) e duas cadeias carbônicas (região hidrofóbicas) (Figura 8B) que dão aos fosfolipídios uma propriedade anfótera (ROMMASI; ESFANDIARI, 2021), possibilitando a encapsulação de fármacos hidrofóbicos (Figura 8C) ou hidrofílicos (Figura 8D).

**Figura 8.** A estrutura do fosfolipídio e de lipossomas



**Fonte:** elaborado pelo autor.

Um dos fosfolipídios mais comumente usados para a produção de lipossomas é a fosfatidilcolina, também conhecida genericamente como lecitina. A fosfatidilcolina é uma mistura natural de diglicerídeos dos ácidos esteárico, palmítico e oleico, ligados ao éster de colina do ácido fosfórico. A fosfatidilcolina de soja hidrogenada (Figura 8A) é o produto da hidrogenação controlada da lecitina e apresenta uma estrutura mais estável que a fosfatidilcolina sintética. Bicamadas desses fosfolipídios em água podem formar lipossomas, uma estrutura esférica em que as cadeias acil estão no interior e não expostas à fase aquosa. A fosfatidilcolina e a fosfatidilcolina hidrogenada são usadas em um grande número de formulações cosméticas como agentes condicionantes da pele e agentes emulsificantes-surfactantes. Quando utilizada a

fosfatidilcolina de soja hidrogenada, os lipossomas apresentam uma excelente biocompatibilidade. Além disso, esses lipossomas podem apresentar biodegradação completa, não-toxicidade e imunogenicidade mínima (LI *et al.*, 2018),

Embora sejam uma ferramenta que funcione bem para sistemas de entrega de drogas, apresentam alta sensibilidade em sua estrutura e susceptibilidade ao estresse do ambiente (tais como temperatura, luz e umidade relativa do ar). Para superar esta dificuldade, e melhorar o desempenho dos lipossomas, há estratégias de uso de componentes para aumentar a estabilidade e função, tais como a adição de proteínas, surfactantes (CHENG *et al.*, 2019; WANG; GRAINGER, 2019), e biopolímeros, como o Álcool Polivinílico (PVA), que apresenta uma estrutura semicristalina biodegradável, biocompatível e não tóxica, com resultados promissores em pesquisas clínicas (RIVERA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021).

Para aumento da estabilidade e melhor controle da liberação de fármaco, matrizes de LN combinadas com nanopartículas têm sido amplamente investigadas para aplicação em Sistemas de Entrega de Drogas (BORGES *et al.*, 2022; GUIDELLI *et al.*, 2013), podendo ser uma potencial ferramenta para se evitar a liberação rápida nas primeiras horas da administração e conseqüentemente se obter maior controle de liberação, o qual no futuro poderá ser utilizado na construção de dispositivos inteligentes com liberação controlada por estímulos orgânicos ou estímulos externos.

Estudos apontam que nanocarreadores, tais como lipossomas, nanopartículas de óxido de ferro, nanopartículas de ouro, entre outros, possuem grande potencial para medicina regenerativa atuando na liberação intracelular de pequenas moléculas, bem como, de macromoléculas como ácidos nucleicos, peptídeos ou proteínas que são instáveis em condições fisiológicas e geralmente incapazes de atravessarem membranas celulares (ADEREM; UNDERHILL, 1999; HILLAIREAU; COUVREUR,

2009; HSIEH, 1994; TYAGI; SANTOS, 2018; WANG; GRAINGER, 2019). Diversos estudos demonstraram que os lipossomas funcionam muito bem como sistema de entrega de droga, além de oferecerem proteção contra a degradação para a droga que será liberada, sendo ainda de fácil fabricação em larga escala e passível de esterilização por radiação esterilizante ou filtração por meio de membranas de 0,22micras.

### **1.10. Distribuição transmucosa medicamentos**

A membrana mucosa reveste todas as passagens e orifícios internos do corpo, permitindo a introdução de drogas em várias áreas anatômicas (JAIN, 2020). A distribuição transmucosa de drogas é uma das rotas de distribuição de medicamentos não invasivas mais antigas, considerando que loções e misturas medicinais são usadas topicamente há milênios. Essa forma de entrega de drogas continua sendo uma das opções mais pesquisadas e amplamente utilizadas devido à sua natureza não invasiva, ausência de degradação enzimática e fácil acessibilidade (RAHAMIM; AZAGURY, 2021).

O transporte de substâncias através das membranas mucosas ocorre por meio de difusão passiva. No estado de equilíbrio, a quantidade de uma substância que atravessa o tecido por unidade de tempo é constante, e os coeficientes de permeabilidade não são afetados pela concentração das soluções ou pela direção da transferência de substâncias não eletrólitas (JAIN, 2020).

Os dispositivos mucoadesivos de liberação controlada podem melhorar a eficácia da administração transmucosa de um medicamento, mantendo-o concentração dentro da janela terapêutica, inibindo a diluição da droga nos fluidos corporais e permitindo o direcionamento e localização de um fármaco em um local específico.

A mucosa vaginal difere em alguns aspectos das demais mucosas dos organismos, principalmente por conta das alterações hormonais durante a menstruação, menopausa ou gestação, que podem alterar espessura do tecido uterino. Geralmente, os fármacos são entregues a esse tecido pela rota transvaginal. Além disso, há barreiras anatômicas e fisiológicas que sistemas de entrega de drogas podem encontrar, tais como o epitélio, enzimas, a microbiota, hormônios, suprimento sanguíneo e fluidos com composição complexa (PATEL *et al.*, 2021).

O uso dos sistemas de entregas de drogas via transvaginal oferece grande vantagem ao evitar o metabolismo de primeira passagem e diminuir a frequência da administração. Além disso, o potencial terapêutico pode ser ampliado com o uso de lipossomas aliados a andaimes biológicos (ZYLBERBERG; MATOSEVIC, 2017), como o LN.

Como exposto anteriormente, ao abordar o impacto da IU na qualidade de vida da mulher e as intervenções disponíveis atualmente – que são poucas e ineficazes – o uso de dispositivo simples e de inserção pela própria paciente pode trazer inúmeras melhoras no tratamento e, conseqüentemente, na saúde e autoestima da mulher. É interessante destacar que a aceitabilidade e o valor do dispositivo é um fator importante a ser considerado, bem como seu custo desde a pesquisa até produção.

### **1.11. Aspectos Econômicos**

O processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos medicamentos é uma jornada complexa e cara, que pode levar muitos anos desde a descoberta inicial até a aprovação final do medicamento pelas autoridades reguladoras. Os custos envolvidos nesse processo são um dos principais fatores que influenciam o preço final dos medicamentos no mercado.

O acesso a tratamentos envolvendo nanotecnologia pode ser limitado por seus altos custos e o mercado de nanomedicamentos é reconhecido como um mercado de alto risco, mas também de alto retorno, e experimenta na atualidade um grande crescimento (SHAH *et al.*, 2020).

A transição entre o desenvolvimento das formulações até o paciente é um grande desafio a produção em larga escala de nanomedicamentos. A escassez de formulações e tratamentos (WILKINSON *et al.*, 2018) é também um cenário preocupante e que precisa ser colocado em consideração no desenvolvimento de uma nova tecnologia.

O preço representa um grande obstáculo para as empresas produtoras de nanoterapêuticos. Os nanomedicamentos são significativamente mais caros de fabricar do que os medicamentos convencionais (BOSETTI, 2015).

É necessário, portanto, uma alocação eficiente dos recursos na área da saúde para controlar o aumento dos gastos (BOSETTI; JONES, 2019) e compreender as barreiras atuais e demandas futuras (ZHANG *et al.*, 2020).

A nanomedicina oferece promessas significativas no campo da saúde, mas enfrenta desafios econômicos que precisam ser superados para tornar suas inovações acessíveis e eficazes em benefício da sociedade como um todo. Como uma área interdisciplinar, onde a nanociência, engenharia e tecnologia têm uma especial interação com as ciências naturais e medicina, a segurança, eficácia e regulamentações devem ser consideradas (PELAZ *et al.*, 2017) para que novos medicamentos, dispositivos e outras aplicações possam melhorar a vida de pacientes de forma eficaz.

A utilização de materiais acessíveis, de baixo custo e com amplo conhecimento já publicado e estabelecido pode ser uma ferramenta crucial para o desenvolvimento de novas tecnologias e auxiliar na redução de custos, bem como podem ser aliados nas fases pré-clínicas e clínicas por possuírem propriedades e interações biológicas melhor compreendidas.

### **1.12. Desafios para o desenvolvimento do dispositivo**

Há diversos desafios com relação a estabilidade química e física no desenvolvimento de estruturas a partir de biopolímeros e nanopartículas (TAN; WANG; SUN, 2021; WANG, 2021), além de limitações de recursos, devido aos altos custos e necessidade de repetições para se atingir o modelo adequado.

Os lipossomas podem apresentar instabilidade coloidal devido a agregação, fusão, floculação, ruptura de membrana e outras interações com o ambiente, que impactam na degradação da estrutura das vesículas durante a formulação e armazenamento. A adição de estabilizantes, polímeros e outras moléculas pode auxiliar na redução dessa instabilidade (YU *et al.*, 2021). Como já mencionado anteriormente, o Álcool Polivinílico é um polímero biocompatível, com caráter hidrofílico (DING *et al.*, 2023) que exhibe ótimos resultados em pesquisas clínicas (RIVERA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021). Sua adição durante a síntese dos lipossomas pode impactar no aumento da estabilidade coloidal e será investigada no decorrer deste trabalho e comparado também com a adição do LN na síntese das nanopartículas.

A CCL7 é uma proteína purificada que apresenta custos elevados para a sua produção, derivada da recombinação gênica, além de demandar equipamentos específicos e também custosos. Os estudos da morfologia, interações moleculares, propriedades físicas e as investigações sobre o perfil de liberação da nova estrutura

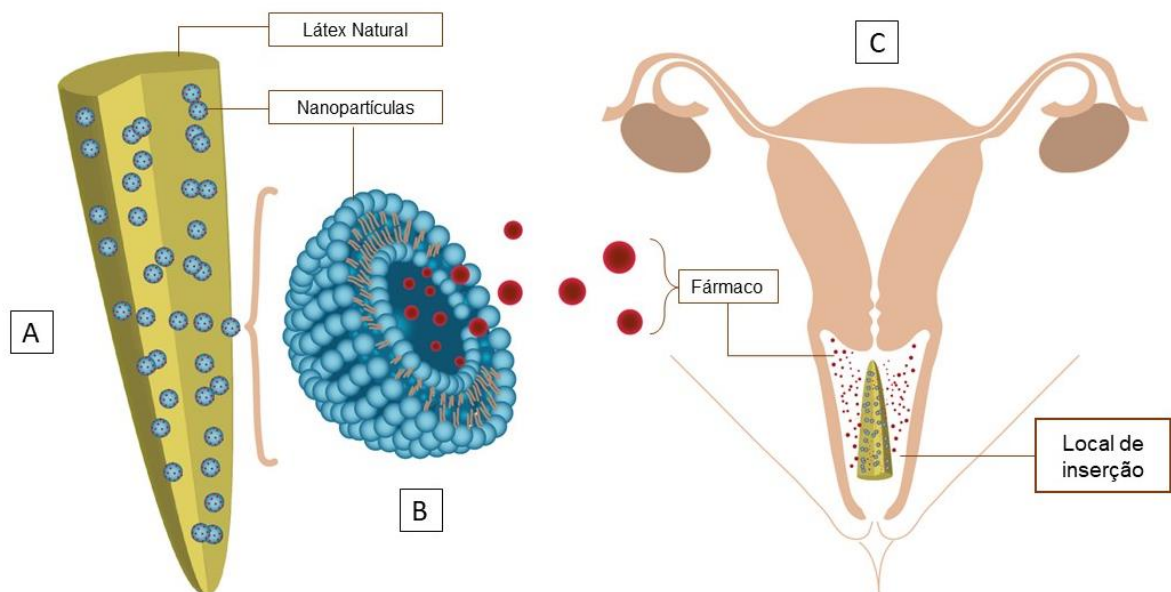
de dispositivo desenvolvida neste estudo é de difícil manejo com a utilização da CCL7. Por conta disso, para o desenvolvimento da estrutura e as investigações mencionadas anteriormente, selecionamos um fármaco acessível e com características hidrofílicas (assim como a CCL7), para os estudos iniciais e o desenvolvimento deste presente trabalho. O atenolol foi o fármaco escolhido, se tratando de uma droga hidrofílica que pertence a um grupo de beta bloqueadores, com ação em receptores  $\beta_1$ , presentes principalmente no coração, sendo utilizado para tratamento de doenças cardiovasculares (HEEL *et al.*, 1979; KIRCH; GÖRG, 1982). Atualmente é encontrado de forma muito acessível e exibe um potencial para ser utilizado como droga no desenvolvimento do modelo do dispositivo em estudos prévios à encapsulação da quimiocina CCL7.

# **2 Motivação e Objetivos**

## 2 Motivação e Objetivos

Os benefícios elencados do emprego de nanotecnologia na modificação da matriz polimérica justificam o uso das nanopartículas para construir este inovador dispositivo de entrega de droga (Figura 9A), com maior controle da taxa de dose liberada por meio da incorporação dos lipossomas carregados com fármaco (Figura 9B), otimizando assim as características da entrega sustentada do LN para o desenvolvimento de novos tratamentos, com inserção de forma transvaginal por pacientes a fim de cumprir o objetivo de liberação *in loco* de fármacos (Figura 9C).

**Figura 9.** Representação esquemática do SVLTF. (A) Estrutura cônica da Matriz de LN com Nanopartículas em sua matriz (superfície e *bulk*). (B) Representação dos lipossomas com a liberação de fármaco e (C) anatomia genital feminina com representação do local de inserção do dispositivo



**Fonte:** elaborado pelo autor.

Portanto, esta estratégia tem sido utilizada para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa, que visa a construção de um dispositivo biocompatível, eficiente,

de baixo custo e de fácil utilização pelas pacientes. A otimização do *biodevice* desenvolvido pelo Projeto Temático DIAMATER (Processo Fapesp: 2016/01743-5) sob patente registrada e identificada BR 10 2020 005536 4 e do dispositivo de entrega vaginal de CCL7 sob patente BR 10 2020 025563 0 é um dos focos deste trabalho que pretende a aplicação deste novo produto em futuras intervenções clínicas pra tratamento MDG e IU, como estratégia “*bench to bedside*”.

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo primário deste projeto é desenvolver um modelo de dispositivo inédito com SVLTF para a liberação controlada de fármaco, baseado em LN associado a lipossomas unilamelares com fármaco atenolol encapsulado. O dispositivo permitirá a liberação sustentada com alto controle de fármaco, por meio da incorporação de lipossomas carregados com atenolol na matriz polimérica do LN.

### **2.2. Objetivos Específicos**

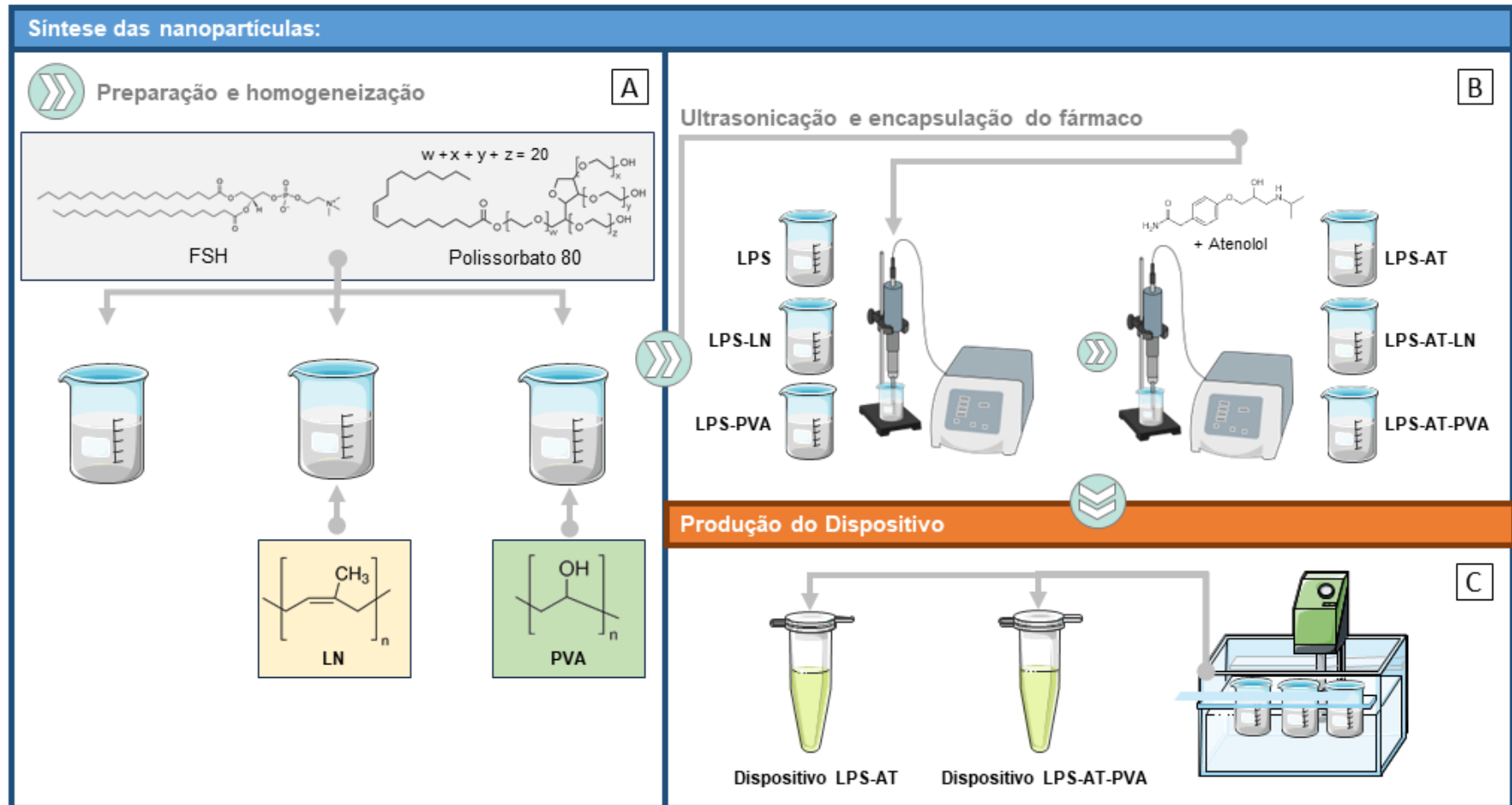
- Construção de lipossomas vazios por ultrasonicação sem revestimento de polímeros e com revestimento de LN e PVA;
- Teste de incorporação do fármaco AT nos lipossomas vazios;
- Teste de adição dos lipossomas carregados com AT na matriz de LN;
- Caracterização morfológica dos lipossomas carregados de fármaco;
- Teste de liberação *in vitro* de AT a partir dos lipossomas;
- Teste de liberação da matriz de LN carregadas com lipossomas contendo AT;
- Teste de interação química dos componentes dos lipossomas contendo AT por meio de FTIR;
- Teste de interação química dos componentes das matrizes de LN (dispositivo) contendo lipossomas com AT por meio de FTIR;
- Caracterização da resistência mecânica dos dispositivos finais;

# **3 Material e Metodologia**

### **3 Material e Metodologia**

Esta seção aborda a metodologia desenvolvida para o presente projeto. A Figura 10 sintetiza esquematicamente a preparação dos lipossomas, seu processo de produção e encapsulação de droga, bem como a incorporação das nanopartículas no LN. Esses passos serão descritos nos próximos tópicos em maiores detalhes.

**Figura 10.** Preparação dos lipossomas e do dispositivo final. (A) indica os produtos usados para a preparação dos lipossomas; (B) indica o processo de ultrasonicação e encapsulação do atenolol após a preparação dos lipossomas e (C) ilustra a incorporação dos lipossomas com atenolol na matriz de LN



Fonte: elaborado pelo autor.

### **3.1. Obtenção do Látex Natural**

O LN comercial foi adquirido de BDF COM. PROD. AGRIC. LTDA com 60% de conteúdo de borracha natural, 4-5% de constituintes como proteínas, lipídio e carboidratos e 35% de água, obtido dos clones RRIM 600 e PB 235 (Lot: 01703/13). Após a extração, a amônia foi utilizada para manter o LN líquido em pH 10.20. O conteúdo de proteínas com alta massa molecular do LN foi reduzido por meio de centrifugação a 1500 rpm por 5 min utilizando equipamento Centrífuga Excelsa® II Modelo 206-BL. Após centrifugação o conteúdo desejado de borracha natural foi redispersado e lavado duas vezes com água para redução de proteínas em solução.

### **3.2. Preparação dos Lipossomas**

#### **3.2.1 Materiais utilizados**

Para síntese das nanopartículas foi utilizado Fosfatidilcolina de soja Hidrogenada - FSH (Epikuron 200 SH, Lucas Meyer GmbH, Hamburg, Germany) e o Polisorbato 80 ou Monooleato de polioxietileno sorbitano também chamado também de Tween 80 (TW80) (TWEEN® 80, Sigma–Aldrich, Darmstadt, Alemanha). Ambos foram gentilmente doados pelo professor Anselmo Gomes de Oliveira. Foi utilizado também o polímero Álcool Polivinílico 18-88 (PVA) (Mowiol® 18-88, Sigma–Aldrich, Darmstadt, Alemanha).

#### **3.2.2. Síntese dos lipossomas por ultrasonização**

A sonicação é uma técnica de grande destaque na preparação de lipossomas a partir de dispersões aquosas de fosfolipídios. Sua utilização remonta aos primeiros estudos com lipossomas (HUANG, 1969), e até hoje, continua sendo um dos métodos mais amplamente empregados devido à sua eficiência e versatilidade na obtenção dessas estruturas lipídicas (AJEESHKUMAR *et al.*, 2021; YAMAGUCHI *et al.*, 2009).

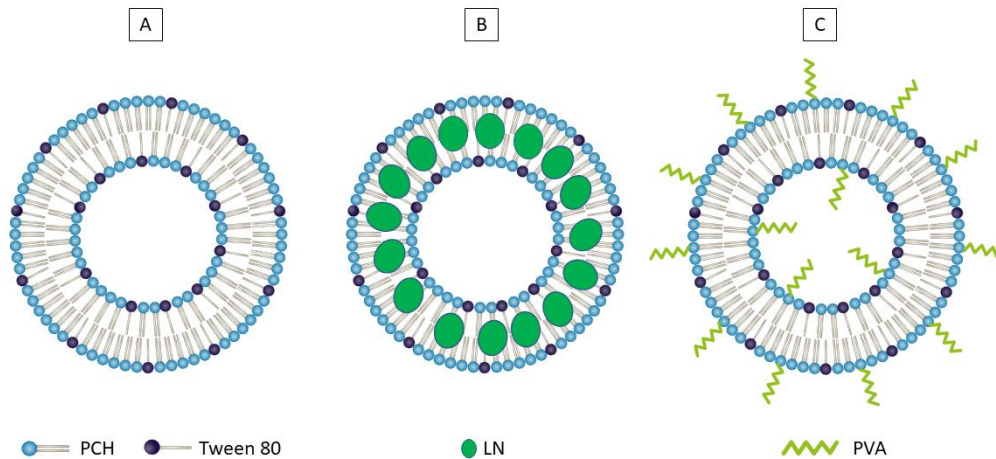
Durante o processo de produção, a adição de energia impacta diretamente na redução do tamanho dos lipossomas. Essa energia é empregada para fragmentar a bicamada lipídica em partes menores, as quais se reorganizam espontaneamente em estruturas esféricas (BARBA *et al.*, 2014). A formação dos lipossomas é influenciada pelas interações hidrofílicas e hidrofóbicas entre as moléculas lipídicas e moléculas de água. Com a adição da energia há um rearranjo entre as moléculas e a formação de vesículas com bicamadas, as quais buscaram alcançar o equilíbrio dinâmico na fase aquosa (MOZAFARI, MORTAZAVI, 2005).

Neste trabalho, foram avaliadas as seguintes preparações:

- Lipossomas livre de polímeros (LPS);
- Lipossoma carregado com atenolol (LPS-AT);
- Lipossomas com adição de LN (LPS-LN);
- Lipossoma carregado com atenolol e revestido com LN (LPS-AT-LN);
- Lipossomas com adição de PVA (LPS-PVA);
- Lipossoma carregado com atenolol e revestido com PVA (LPS-AT-PVA).

A Figura 11 demonstra um modelo conceitual das preparações sem o fármaco propostas dentro deste projeto, sendo 11A o modelo estrutural mais tradicional sem a adição de polímeros (LPS), enquanto 11B traz a proposta do LN disposto na porção hidrofóbica da nanopartícula (LPS-LN), uma tentativa de propor um modelo de lipossoma com maior estabilidade. Por último, seguindo também a intenção de melhorar a estabilidade e obter melhor controle da liberação da droga, 11C sugere a associação dos lipossomas com o PVA ligado à porção hidrofílica da estrutura (LPS-PVA).

**Figura 11.** Modelo conceitual das estruturas dos lipossomas estudadas

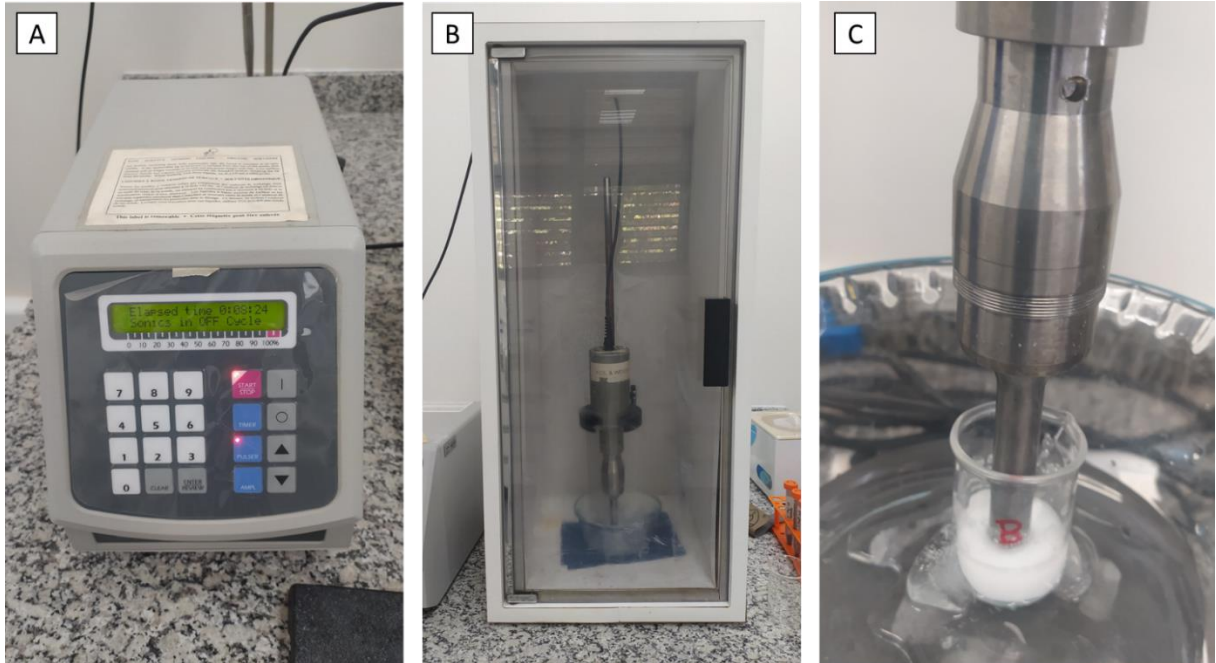


**Fonte:** elaborado pelo autor.

Para a preparação dos lipossomas foi utilizada FSH (Epikuron 200 SH, Lucas Meyer GmbH, Hamburg, Germany), Tween 80 (TW80) (Lio Serum Produtos Laboratoriais e Hospitalares, Ribeirão Preto, Brasil) e água milli-Q, seguindo uma proporção 5:1 para os solutos. Na tabela 1 as quantidades de cada material para as preparações foram descritas. Essa mistura foi solubilizada manualmente para homogeneização e, em seguida, foi submetida a um processo de ultrasonicação utilizando equipamento Sonicador (SONICS VIBRA-CELL™ VCX 750, SONICS & MATERIALS, Connecticut, USA) com amplitude em 20%, durante um intervalo de tempo de 10 a 15 minutos (Figura 12 A-B). Todas as preparações foram colocadas em banho de gelo durante este processo para evitar degradação e evaporação do material devido à alta temperatura que a ponta do ultrasonicador pode alcançar (Figura 12C).

Duas configurações de pulsos foram testadas quanto a influência nas características finais dos lipossomas. Para tanto, preparações com diferentes pulsos foram comparadas. Foi utilizado pulso On de 5 segundos com pulso Off de 10 segundos (5/10) e pulso On de 59 segundos com pulso Off de 15 segundos (59/15).

**Figura 12.** Etapas da ultrasonicação. (A) Equipamento para ultrasonicação; (B) ponta ultrasonicadora em caixa redutora de ruídos e (C) processo de ultrasonicação com banho de gelo



**Fonte:** próprio autor.

Para a preparação das LPS-LN o mesmo protocolo das LPS foi seguido, com adição de LN na preparação a ser ultrasonicada. Duas proporções de LN foram testadas, sendo utilizado 5uL de LN para cada 1 mL e 10uL para cada 1mL de volume total de água.

Para a preparação das LPS-PVA, a mesma formulação e protocolo para preparação do LPS foram utilizados, com adição de PVA (Mowiol® 18-88, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) preparados na concentração de 4g/mL de água milli-Q. Para a preparação a ser ultrasonicada, 10uL de PVA foram adicionados.

Os dados organizados para melhor consulta das preparações e pulso se encontram na Tabela 1.

**Tabela 1.** Formulação e programação de pulso de cada preparação.

<b>Preparação</b>	<b>Pulso</b>	<b>FSH</b>	<b>TW80</b>	<b>Água</b>	<b>LN (uL)</b>	<b>PVA (uL)</b>
<b>LPS</b>	5/10	150	20	5		
	59/15	150	20	5		
<b>LN-LPS</b>	5/10	150	20	5	25	
	59/15	150	20	5	25	
<b>LN-LPS</b>	5/10	150	20	5	50	
	59/15	150	20	5	50	
<b>PVA-LPS</b>	5/10	150	20	5		10
	59/15	150	20	5		10

Fonte: elaborado pelo autor.

### 3.3. Encapsulação do fármaco

O fármaco atenolol (Ate) (Sandoz Ltda, Cambé, Brasil), foi obtido em formato de comprimido com excipientes. 0,5mL de uma solução 25mg/mL de atenolol foi adicionado às nanopartículas preparadas, em um novo processo de ultrasonicação seguindo o protocolo de cada preparação.

### 3.4. Caracterização dos lipossomas

Os principais aspectos que definem a eficácia de uma formulação de lipossoma incluem tamanho, potencial zeta, liberação, estabilidade e farmacocinética. O tamanho é determinado pelo método de preparação do lipossoma, enquanto o potencial zeta é influenciado pela composição do mesmo (LARGE *et al.*, 2021).

#### 3.4.1. Morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura

Na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), feixes de elétrons varrem a superfície de uma amostra para produzir uma imagem ampliada de um objeto. O MEV não é comumente utilizado atualmente como um método para a caracterização de lipossomas, por exigir métodos de liofilização ou secagem do material para visualização (RUOZI *et al.*, 2011). A própria estrutura dos lipossomas pode ser afetada pelas condições de alto vácuo necessários para essa técnica de preparação.

No entanto, apesar dessa desvantagem, o MEV é uma técnica acessível e capaz de fornecer informações gerais sobre a estrutura concêntrica das várias camadas lipídicas, além de detalhes sobre o tamanho e a morfologia esférica dos lipossomas (ROBSON *et al.*, 2018).

Dessa forma, a MEV foi utilizada para analisar a morfologia das nanopartículas. Foram avaliadas as preparações LPS, LPS-LN (25uL de LN) e LPS-PVA. Alíquotas das dispersões foram secadas em estufa a 36°C e metalizadas com ouro. As amostras foram examinadas na magnificação de X500 a X40k utilizando o equipamento MEV (modelo EVO 15, Zeiss, Germany) com 15 kV e equipamento MEV-FEG (Modelo JSM7500F, JEOL, Toquio, Japão).

#### **3.4.2. Tamanho de Partícula e Potencial Zeta**

Uma vez que os métodos de microscopia fornecem dados pouco quantitativos quanto à distribuição do tamanho de partículas, os métodos de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS – do inglês *Dynamic Light Scattering*) podem ser aplicados para fornecerem informações mais assertivas e confiáveis para esta propriedade.

O DLS mede as flutuações de luz dispersa pelas partículas em movimento browniano de maneira dependente do tempo. Neste método de análise assume-se que: as partículas possuem formato esférico e têm seu raio hidrodinâmico medido; as amostras não devem absorver, iluminar ou fluorescer na frequência da fonte de luz; diluições podem ser necessárias para evitar espalhamento múltiplo e interações partícula-partícula (FAN; MARIOLI; ZHANG, 2021).

O índice de polidispersão (PDI) indica se a distribuição do tamanho das partículas se apresenta de forma homogênea, quanto menor o PDI, maior a

homogeneidade, sendo que valores de PDI abaixo de 0,3 indica uma distribuição uniforme (LIN *et al.*, 2018).

O tamanho de partícula e o PDI foram analisadas por meio do equipamento Analisador de tamanho de partícula, modelo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical, Worcestershire, United Kingdom). Os lipossomas das preparações foram diluídos em concentrações apropriadas utilizando água Milli-Q e os testes foram conduzidos em temperatura ambiente.

### **3.4.3. Análise de interações químicas dos preparados por FTIR**

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica que permite identificar as interações químicas de estruturas preparadas, além de também ser possível sua aplicação para acompanhar a estabilidade e degradação (MOHAMED *et al.*, 2017). A identificação se dá com auxílio da investigação de grupos funcionais, assim como possíveis ligações moleculares entre os compostos químicos. A compreensão das posições das bandas de absorção no espectro do infravermelho, expressas em números de onda, oferece uma oportunidade de identificar diversos componentes químicos (por exemplo, amidas aromáticas), que muitas vezes não são detectáveis nos espectros provenientes da espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS) (MOHAMED *et al.*, 2017).

A FTIR com Reflexão Total Atenuada (ATR) foi medida diretamente nas soluções das amostras usando um espectrômetro FTIR-4600 (JASCO, Tóquio, Japão). As varreduras foram realizadas de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$  com uma resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  à temperatura ambiente.

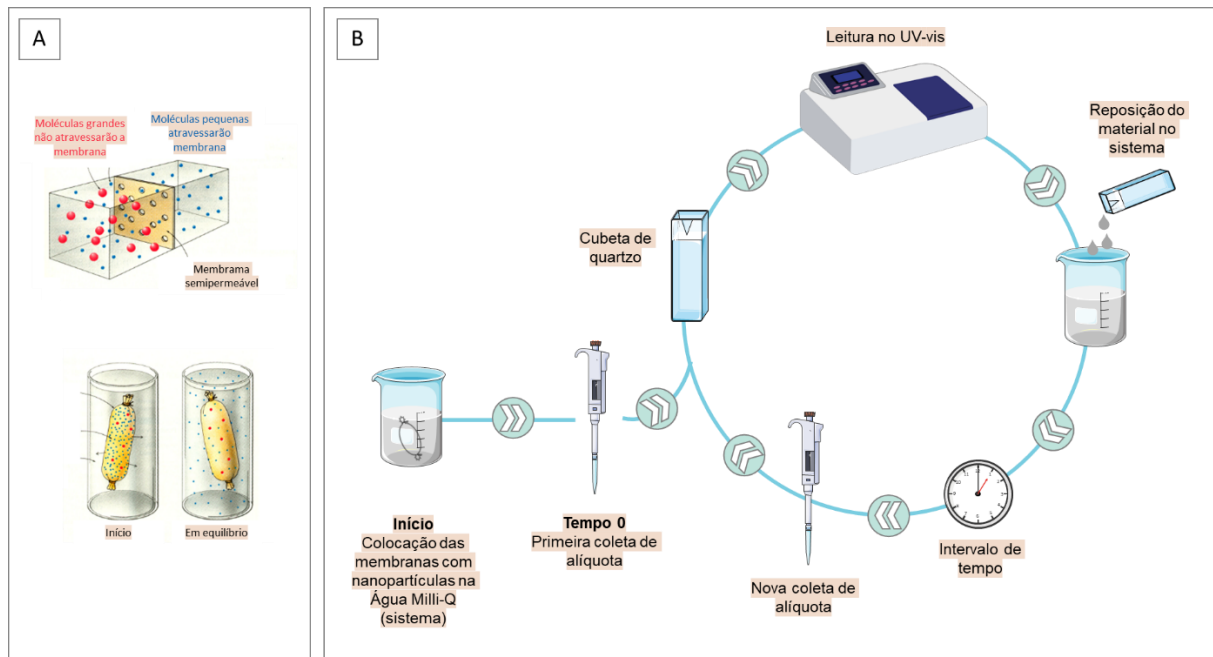
#### **3.4.4. Cinética de Liberação do Atenolol dos lipossomas**

A caracterização da liberação de medicamentos é comumente realizada *in vitro* usando o método de diálise. Neste tipo de análise é possível obter-se uma medida da taxa em que o fármaco será liberado das formulações de lipossomas. Para isso os lipossomas são colocados dentro de sacos de diálise pré-hidratadas que aprisionam os lipossomas, porém permitindo que a droga atravesse a membrana. A concentração do medicamento liberado é medida em diferentes momentos (AKBARZADEH *et al.*, 2013) e os dados podem ser plotados em concentração de droga pelo tempo.

Foi testada a cinética de liberação *in vitro* para as preparações LPS-AT e LPS-AT-PVA. 50uL de cada preparação de nanopartícula foi colocada em uma membrana de celulose para diálise com as extremidades fechadas. Em seguida as amostras foram colocadas em água Milli-Q (tempo zero). Uma alíquota foi imediatamente analisada em Espectrofotômetro modelo PerkinElmer LAMBDA 1050+ UV/Vis/NIR (UV-Vis, PerkinElmer, Waltham, USA) e demais alíquotas foram coletadas e medidas em tempos específicos entre 0 a 150 horas. Para a quantificação do atenolol, a absorbância utilizada no equipamento espectrofotômetro foi medida no comprimento de onda na faixa do espectro de 224nm. Concentrações conhecidas de atenolol foram preparadas e medidas no espectrofotômetro para a realização de uma curva-padrão.

A Figura 13 traz esquematicamente as etapas ilustradas deste protocolo.

**Figura 13.** Esquema do protocolo de cinética de liberação. As amostras foram colocadas em membranas para diálise (A) e colocadas em água milli-Q para acompanhamento da liberação do fármaco (B), onde alíquotas foram lidas em equipamento UV-vis em intervalos específicos de tempo. O material, a cada leitura, foi repostado dentro do mesmo sistema



Fonte: elaborado pelo autor com elementos gráficos de Servier Medical Art e BERG; TYMOCZKO; STRYER (2002).

### 3.5. O dispositivo SVLTF

#### 3.5.1. Preparação do SVLTF

O dispositivo SVLTF foi preparado com a incorporação das nanopartículas produzidos conforme o item 3.2.2 e 3.3. As LPS-AT e LPS-AT-PVA foram incorporadas na matriz de LN em fase líquida e homogeneizadas manualmente, em seguida, foram colocadas em banho de ultrassom por um intervalo de 30 min, formando o dispositivo LPS-AT e dispositivo LPS-AT-PVA, respectivamente.

Após este processo, alíquotas de 1 mL foram colocadas em *eppendorfs* e posteriormente, levadas para a estufa seca a 50°C, por um período de 7 dias para completa secagem do LN.

### **3.5.2. Morfologia da superfície e *bulk* por Microscopia Eletrônica de Varredura**

Para a caracterização dos dispositivos LPS-AT e LPS-AT-PVA a MEV foi utilizada para a avaliação da superfície da matriz de LN quanto a presença de partículas (lipossomas) isoladas ou em agregados, bem como outras características como rugosidade e porosidade foram observadas. Cortes transversais foram realizados no dispositivo para avaliação das mesmas propriedades no *bulk*.

Essa avaliação foi realizada conforme o item 2.4.1 com o equipamento MEV-FEG (Modelo JSM7500F, JEOL, Toquio, Japão).

### **3.5.3. Estudo das interações químicas antes e após luz-UV**

A fim de identificar possíveis interações químicas entre a droga, nanopartículas e a matriz de LN e possíveis degradações, análises utilizando-se FTIR foram realizadas de acordo com o item 3.4.3 nos dispositivos LPS-AT e LPS-AT-PVA.

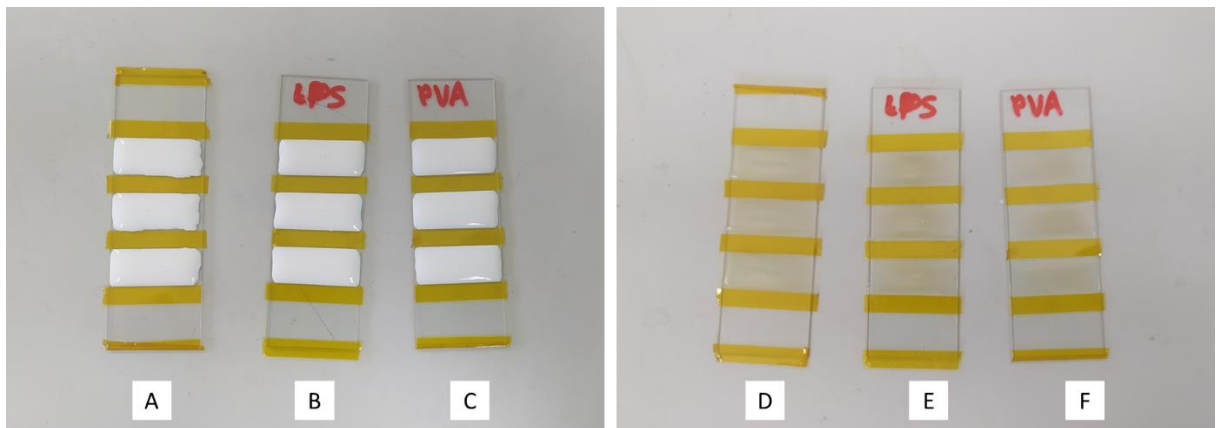
Em razão de futuras utilizações do dispositivo necessitarem de esterilização para evitar a proliferação de microrganismos e assim garantirem segurança ao paciente, foi testado a influência da luz UV (Ultravioleta) – um germicida com potencial de destruir membranas biológicas e material genético – nos dispositivos preparados. Para isso, foi utilizado o equipamento UV Ozone Clener (Ossila, Sheffield UK). As amostras foram submetidas a 20 minutos de luz ultravioleta-C na faixa de 100nm-280nm por meio de lâmpada germicida e irradiação germicida do ozônio.

### 3.5.4. Resistência Mecânica de membranas contendo LPS-AT e LPS-AT-PVA

Os ensaios de tração serão realizados de acordo com a norma ASTM D412:2016 (ASTM, 2016). Para esta avaliação misturas contendo LN, LN incorporado com LPS-AT e LN incorporado com LPS-AT-PVA foram homogeneizadas e 200  $\mu$ L de cada mistura foi depositada por *drop casting* em lâminas com área aproximada de 1 cm x 2,5 cm (Figura 14) e submetidas a temperatura controlada de 50°C por um período de até 2 horas para a formação das membranas. No mínimo três amostras de cada preparação foram avaliadas quanto a resistência ao estiramento.

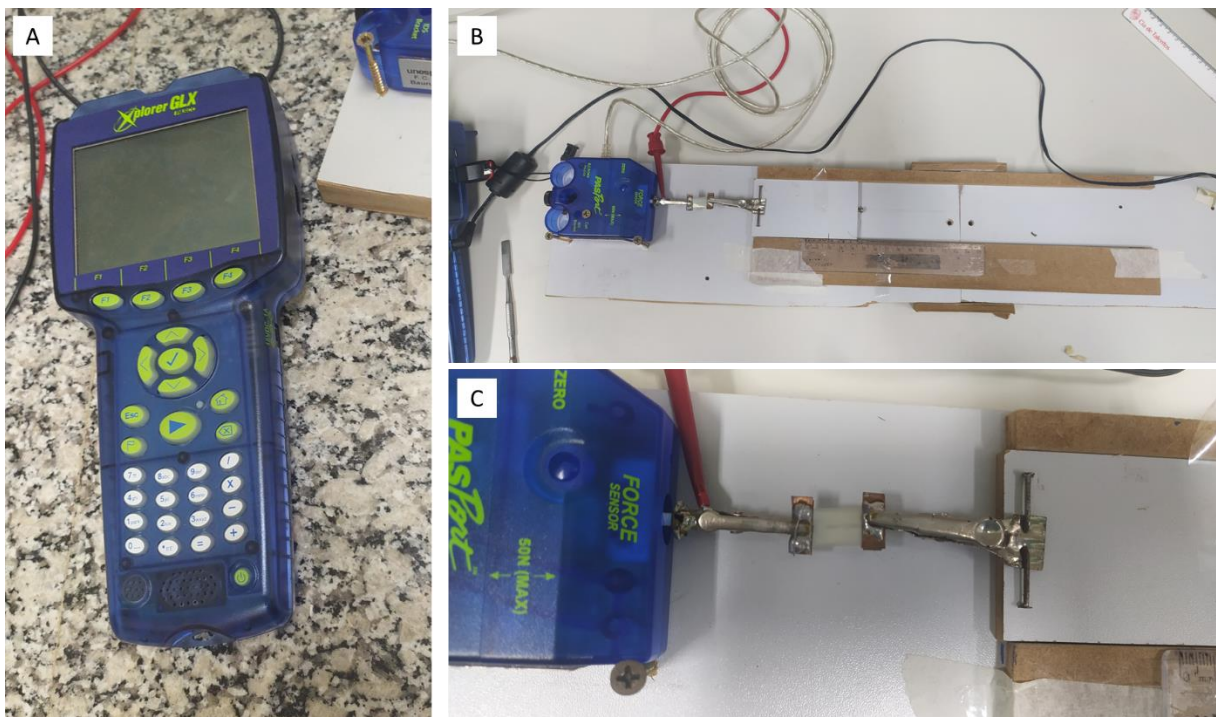
As medidas de força foram obtidas por meio do sensor de força Xplorer GLX (PASCO, Roseville, EUA) (Figura 15A), que determina a tensão realizada durante o processo de estiramento da amostra. As amostras (exemplificada na Figura 16) foram colocadas em um sistema (Figura 15B) desenvolvido por Silva (2021) contendo uma base plana, trilhos-guia e bloco móvel. A amostra foi posicionada entre o sensor e o bloco móvel (Figura 15C) para que pudesse ser acompanhada a deformação e força durante o estiramento. A deformação foi medida com o auxílio de uma régua plástica colocada no equipamento. O sensor retorna a curva de resposta força *versus* tempo para cada corpo de prova e aliados aos dados de deformação a cada período de tempo a curva tensão *versus* deformação foi gerada. Nesse ensaio foram verificadas as propriedades de resistência ao alongamento e módulo de elasticidade. As membranas foram tensionadas até ruptura.

**Figura 14.** Misturas contendo LN (A), LN com LPS (B) e LN com LPS-PVA (C) depositadas em lâminas. D, E e F mostram as membranas após o processo térmico de secagem, na ordem em que foram elencadas, respectivamente



Fonte: elaborado pelo autor.

**Figura 15.** Sistema para avaliação do estiramento. (A) traz o sensor de força Xplorer GLX; (B) traz a visualização do sistema integralmente e (C) mostra uma mostra posicionada entre o sensor e o bloco móvel



Fonte: elaborado pelo autor.

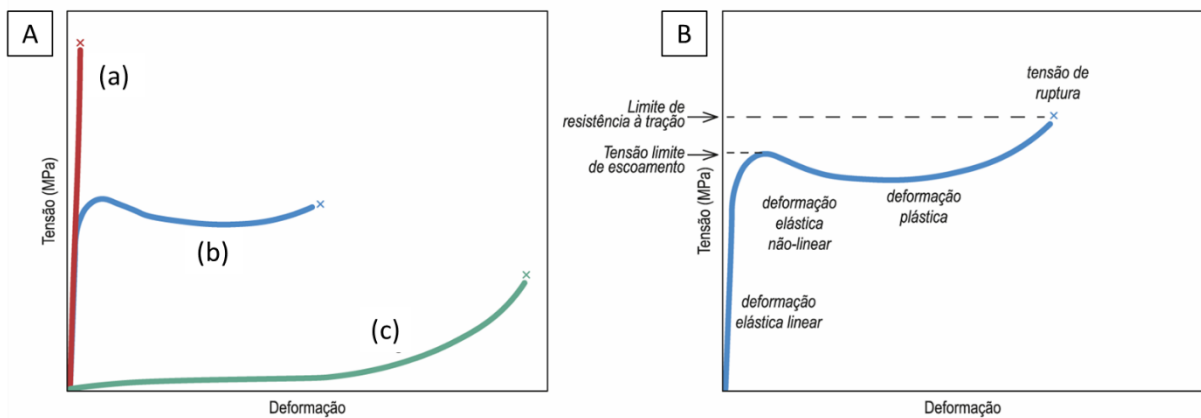
**Figura 16.** Detalhe da membrana após deposição e secagem, antes da avaliação da resistência por estiramento



Fonte: elaborado pelo autor.

A Figura 17 ilustra os principais parâmetros acerca a resistência mecânica de corpos de prova, com a apresentação da curva tensão *versus* deformação e as propriedades mecânicas para estiramento costumeiramente verificadas em materiais.

**Figura 17.** (A) Representação da curva de tensão versus deformação para diferentes corpos de prova sendo (a) comportamento frágil (b) comportamento plástico e (c) comportamento elástico. (B) traz as propriedades mecânicas principais em um ensaio de tração



Fonte: elaborado pelo autor baseado em Shackelford (2008) e Callister (2018).

A tensão é calculada mediante a equação (1), sendo  $\sigma$  a tensão de deformação a partir da área inicial avaliada,  $F$  representa a carga aplicada e  $A$  a área de seção transversal (SHACKELFORD, 2008). Para realizar os cálculos de deformação ( $\epsilon$ ), emprega-se a equação (2), na qual  $l$  representa o comprimento da amostra no momento da medição, após a aplicação de uma determinada deformação, e  $l_0$  é o comprimento inicial da amostra. O módulo de Young ( $E$ ), também conhecido como módulo de elasticidade, está intimamente associado à rigidez do polímero. Esse valor é derivado da inclinação da curva na região de deformação elástica linear (SHACKELFORD, 2008), conforme expresso na equação (3) e ilustrado na Figura 17B.

$$\sigma = F/A \quad (1)$$

$$\epsilon = (l - l_0) / l_0 \quad (2)$$

$$E = \sigma / \epsilon \quad (3)$$

### 3.5.5. Cinética de Liberação do Atenolol do SVLTF

O dispositivo LPS-AT e dispositivo LPS-AT-PVA foram avaliados em relação à cinética de liberação do atenolol seguindo a mesma metodologia do item 3.4.4, com a colocação dessa vez, dos dispositivos no interior da membrana de diálise. A cinética neste caso também foi acompanhada por aproximadamente 150 horas e realizada em triplicata.

### **3.6. Análise estatística e visualização de dados**

Para análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism® v.8.0. Comparações das medidas entre os grupos foram feitas utilizando ANOVA one-way seguido de comparações múltiplas via teste de Tukey. O valor de p adotado para comparações estatisticamente significantes foi de  $p < 0,05$ .

Para a construção dos gráficos foi utilizado o software Origin Lab v2018.

Para a criação das artes, ilustrações e esquemas foi utilizado o software Adobe Illustrator 2023.

Algumas artes deste trabalho foram parcialmente geradas usando elementos de Servier Medical Art, fornecida pela Servier, sob licença Creative Commons Attribution 3.0.

# 4 Resultados e Discussão

## **4 Resultados e Discussão**

Este capítulo possui duas seções principais:

Na primeira seção serão discutidos os resultados obtidos a partir das preparações de nanopartículas LPS-AT, LPS-AT-LN e LPS-AT-PVA;

Na segunda seção serão discutidos os resultados acerca do dispositivo LPS-AT e dispositivo LPS-AT-PVA.

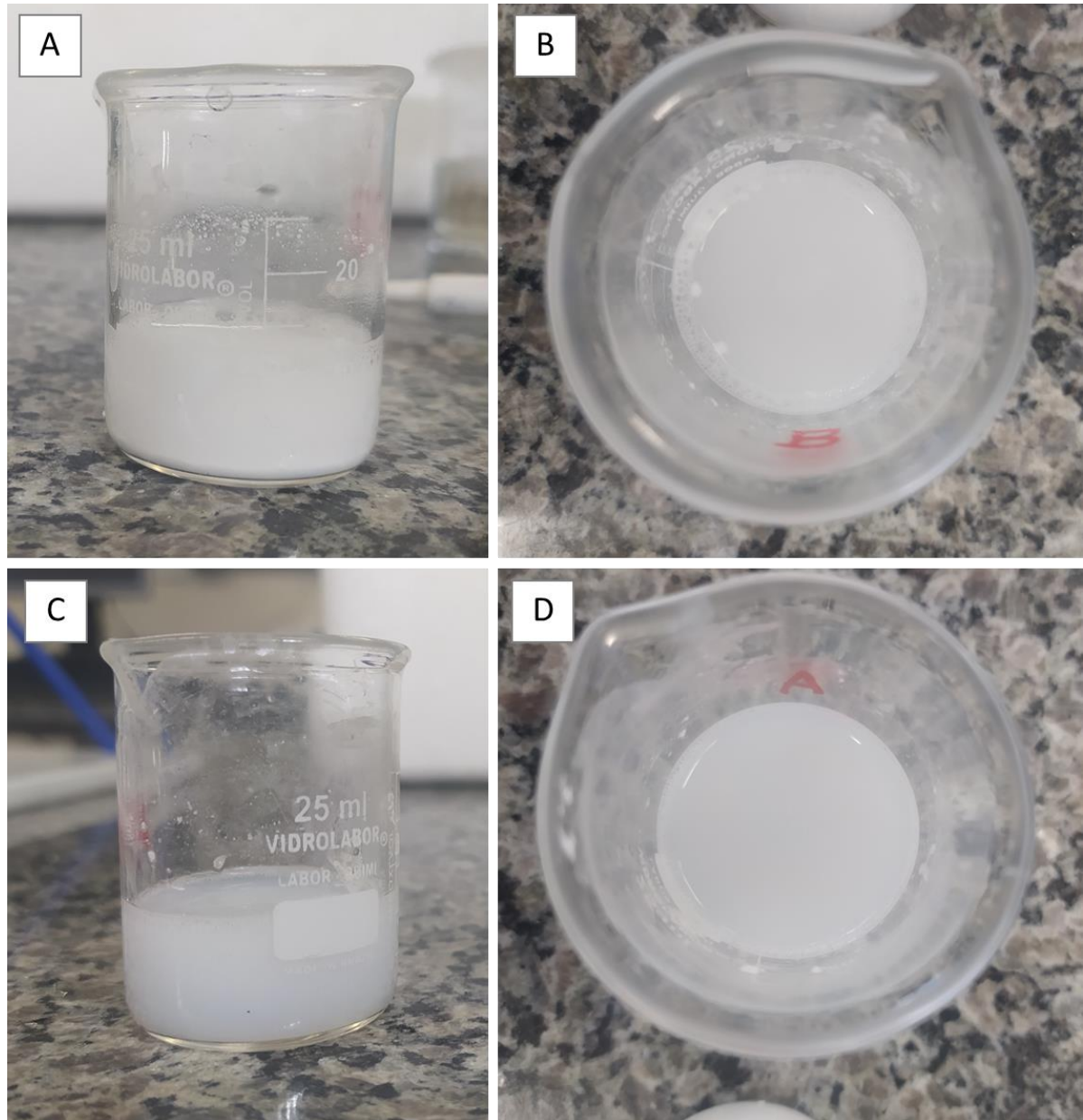
### **4.1. Caracterização dos lipossomas**

#### **4.1.1. Aspectos das preparações pós-ultrasonicação**

A Figura 18A apresenta uma das preparações homogeneizadas contendo FSH, TW80 e água ainda não submetido à ultrasonicação, é possível identificar um aspecto leitoso, com decantação da FSH e grânulos em 18B. Por sua vez, a Figura 18C apresenta a mesma preparação, com a diferença de ter sido submetida à ultrasonicação, essa última amostra está bem homogeneizada e com maior translucidez. Esse aspecto demonstra no aspecto macroscópico, ou a olho nu, a utilização da ultrasonicação aplicada para a síntese dos lipossomas.

A mudança no tamanho da partícula pode ser detectada pela visualização das alterações visuais nas amostras. O aumento da translucidez foi verificada nas preparações e corroboram com outros estudos com lipossomas (GUNER; OZTOP, 2017) uma vez que com a diminuição do tamanho das partículas, a luz é capaz de penetrar nas amostras. Este relevante resultado é o primeiro indício da eficiência da ultrasonicação na preparação dos lipossomas, entretanto este resultado isolado não traz respostas claras e quantitativas sobre as estruturas preparadas. O estudo do tamanho de partícula e Pdl no próximo tópico será capaz de oferecer maior compreensão sobre esses resultados.

**Figura 18.** Diferenças na translucidez dos preparados após a ultrasonicação (A – à esquerda – e B) e antes (A – à direita – e C)



Fonte: próprio autor.

#### 4.1.2. Diâmetro de partícula e Pdl

As medidas de tamanho de diâmetro das nanopartículas avaliadas pelo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical, Worcestershire, United Kingdom) estão identificadas na Figura 19 e tabela 2. Foram avaliados lipossomas sem o fármaco. As LPS-PVA e LPS apresentarem os menores valores para o tamanho de partícula

(medido em diâmetro hidrodinâmico) comparada às demais preparações considerando ambos os tipos de modo de pulso, 59/15 e 5/10 (s/s). Para as LPS-LN, as médias apresentadas foram muito superiores às esperadas para aplicação em entrega de drogas, com médias obtidas entre 466 e 918 nm.

Foram encontradas diferenças estatísticas comparando-se os grupos, como observado no gráfico da Figura 19. Considerando apenas a influência dos pulsos 59/15 ou 5/10 (s/s), é interessante destacar que houve diferença estatística apenas no grupo LPS-LN50 (LPS-LN com adição de 50 $\mu$ L de LN). Quando utilizado menores quantidades de LN para preparação dos lipossomas, como é o caso das LPS-LN25 (LPS-LN com adição de 25 $\mu$ L de LN) não houve diferença entre os pulsos. Para os demais grupos as diferentes configurações de pulsos não trouxeram mudanças significativas no tamanho das nanopartículas.

As principais diferenças no tamanho que podem ser notadas dizem respeito a composição dos grupos. As LPS-PVA apresentaram os menores valores para o tamanho de nanopartícula, seguida pelas LPS. Ainda, o grupo LPS-PVA com pulso 5/10 (s/s) se mostrou estatisticamente significativo comparado a LPS também com pulso 5/10 (s/s). Os menores valores obtidos para LPS-PVA podem decorrer da ação do álcool sobre a tensão interfacial, impactando na redução do tamanho hidrodinâmico para esses lipossomas. Para os pulsos 59/15 e 5/10 (s/s), as LPS apresentaram tamanho médio para os lipossomas de  $301\pm 85$  e  $411\pm 128$  nm, respectivamente, enquanto que para as LPS-PVA as médias foram  $252\pm 58$  e  $161\pm 13$  nm, respectivamente. Ambos os valores estão dentro da faixa prevista para aplicações médicas e podem favorecer a permeabilidade dos lipossomas através da matriz de LN.

Os resultados obtidos para as preparações LPS e LPS-PVA são muito vantajosas para aplicações em dispositivos para entrega de drogas. Na literatura, resultados similares para os tamanhos analisados foram relatados, visto que para aplicações médicas geralmente são utilizadas nanopartículas de 50 a 450nm (ROMMASI; ESFANDIARI, 2021). Essas faixas de tamanho favorecem a permeabilidade dos lipossomos através da matriz de LN. Nanopartículas nessa faixa de tamanho reduzido tem maior sucesso na encapsulação uniforme de drogas e na liberação de fármacos por maiores períodos de tempo (LARGE *et al.*, 2021).

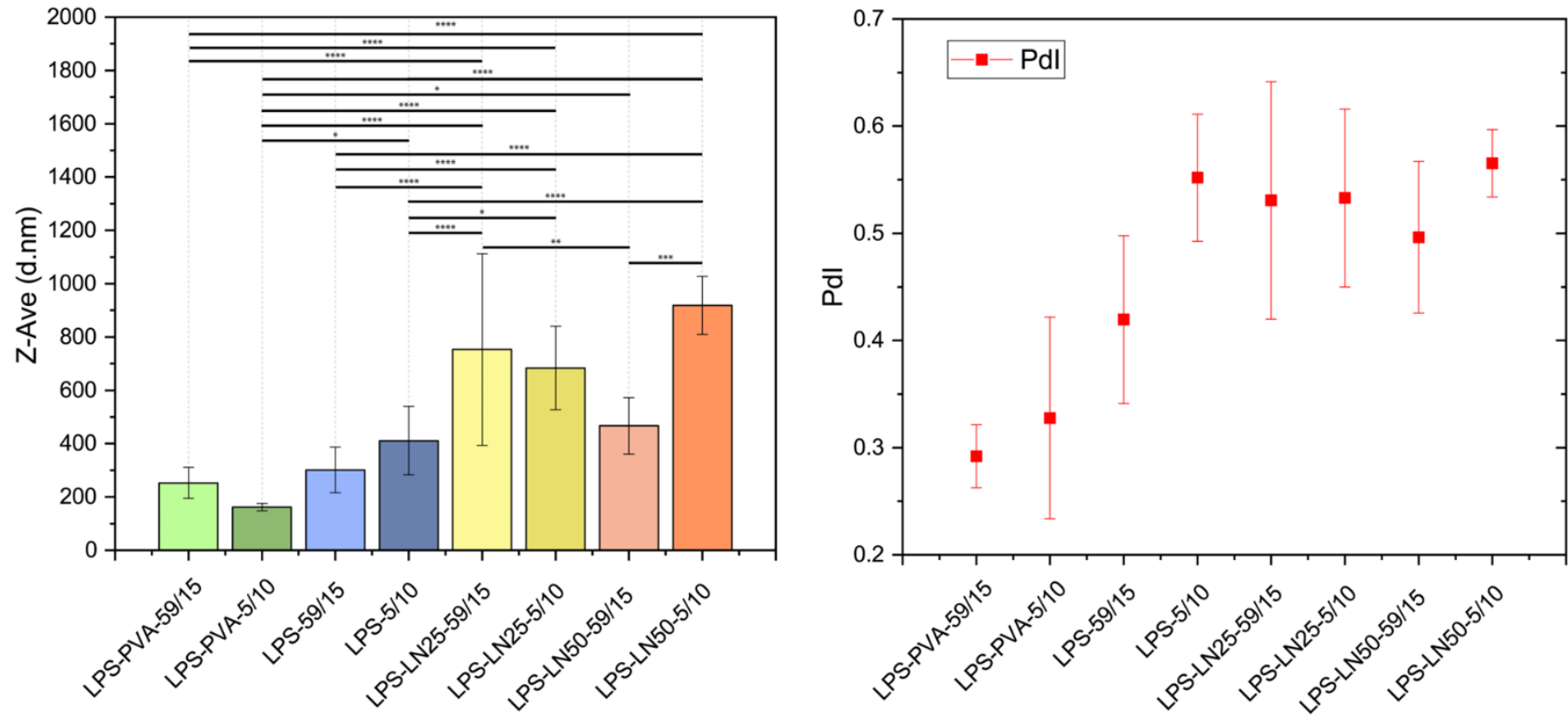
Quanto ao valor do Pdl (Tabela 2 e Figura 19), apenas as LPS-PVA se mantiveram próximas de valores uniformes ( $Pdl < 0,3$ ), podendo-se inferir que houve a ocorrência de distribuições heterogêneas em relação ao tamanho das partículas analisadas, resultado já esperado devido a formação de nanopartículas com pouco grau de uniformidade utilizando o método de ultrasonicação (AKBARZADEH *et al.*, 2013; LARGE *et al.*, 2021). Métodos de extrusão são mais eficientes para se atingir a uniformidade do tamanho das nanopartículas (AKBARZADEH *et al.*, 2013) e poderiam ser adotados para próprias aplicações para melhor selecionar os tamanhos desejados e tornar este valor mais ideal (mais próximo ao zero, com dispersões mais homogêneas).

Analisando-se as preparações de LPS-LN, para ambas as configurações de pulsos durante a síntese, os valores se mostraram mais elevados ainda, sugerindo que o modelo de preparação que inclui o LN já nas nanopartículas com intuito de estabilização pode não ser o mais adequado. É importante destacar ainda que as partículas de borracha podem exibir naturalmente uma distribuição de tamanho heterogêneo (SRIRING *et al.*, 2020).

Diversos trabalhos na literatura abordam que o tempo de ultrasonicação é um fator que impacta na redução do tamanho das nanopartículas e PDI (CHEN; CHANG, 2020; NAM; KIM; SEONG, 2018). Embora não investigado a influência do tempo na redução do tamanho, o tempo adotado para a ultrasonicação neste estudo segue o mesmo adotado em outros trabalhos encontrados na literatura.

Em razão dos resultados vantajosos exibidos, as LPS e LPS-PVA foram selecionadas para serem incorporadas na matriz de LN e serem avaliadas quanto à liberação e características morfológicas e físico-químicas.

**Figura 19.** Tamanho de partícula e índice de polidispersão das preparações de nanopartículas. Os identificadores 59/15 e 5/10 dizem respeito aos pulsos aplicadas na ultrasonicação de cada preparação. (Teste de normalidade D'Agostino & Pearson; Tukey's post hoc para múltiplas comparações. \*:p<0,05; \*\*: p<0,006; \*\*\*: p<0,0002; \*\*\*\*: p<0,0001)



Fonte: elaborado pelo autor.

**Tabela 2.** Resultados individuais dos tamanhos de partícula (d.nm) e Pdl para cada preparação expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP). Os identificadores 59/15 e 5/10 dizem respeito aos pulsos aplicadas na ultrasonicação de cada preparação.

Preparações	LPS-PVA-59/15	LPS-PVA-5/10	LPS-59/15	LPS-5/10	LPS-LN25-59/15	LPS-LN25-5/10	LPS-LN50-59/15	LPS-LN50-5/10
	324.3 $\pm$ 0.3	143.3 $\pm$ 0.273	139.8 $\pm$ 0.317	589.5 $\pm$ 0.59	1165 $\pm$ 0.459	614.2 $\pm$ 0.69	648.9 $\pm$ 0.563	836.3 $\pm$ 0.56
	329.2 $\pm$ 0.3	145.1 $\pm$ 0.262	134.7 $\pm$ 0.377	652 $\pm$ 0.563	1216 $\pm$ 0.401	509.9 $\pm$ 0.52	615.8 $\pm$ 0.552	790.2 $\pm$ 0.60
	324.3 $\pm$ 0.3	143 $\pm$ 0.245	137.9 $\pm$ 0.382	616.3 $\pm$ 0.62	1155 $\pm$ 0.433	502.1 $\pm$ 0.49	540.1 $\pm$ 0.575	850.5 $\pm$ 0.56
	191.6 $\pm$ 0.2	175.1 $\pm$ 0.458	406.1 $\pm$ 0.473	368.7 $\pm$ 0.49	493.6 $\pm$ 0.71	606.3 $\pm$ 0.41	433.9 $\pm$ 0.48	982.5 $\pm$ 0.57
	194.6 $\pm$ 0.2	172.9 $\pm$ 0.452	383.5 $\pm$ 0.429	341.4 $\pm$ 0.62	493.4 $\pm$ 0.717	632.9 $\pm$ 0.57	384.6 $\pm$ 0.487	977.7 $\pm$ 0.57
	192.9 $\pm$ 0.2	170.6 $\pm$ 0.447	394.6 $\pm$ 0.394	362.4 $\pm$ 0.55	481.7 $\pm$ 0.688	657.4 $\pm$ 0.57	390.5 $\pm$ 0.497	1073 $\pm$ 0.51
	236.5 $\pm$ 0.2	167.2 $\pm$ 0.284	303.9 $\pm$ 0.404	368.7 $\pm$ 0.49	800.3 $\pm$ 0.61	894.2 $\pm$ 0.58	393.5 $\pm$ 0.361	
	243 $\pm$ 0.274	166.8 $\pm$ 0.26	301.5 $\pm$ 0.398	341.4 $\pm$ 0.62	772 $\pm$ 0.47	804.9 $\pm$ 0.49	384.2 $\pm$ 0.417	
	238.9 $\pm$ 0.2	169.1 $\pm$ 0.268	306.4 $\pm$ 0.452	362.4 $\pm$ 0.55	779.3 $\pm$ 0.448	928.9 $\pm$ 0.45	408.6 $\pm$ 0.534	
			286.1 $\pm$ 0.367	327.3 $\pm$ 0.47	902.6 $\pm$ 0.558			
			286.1 $\pm$ 0.381	307.9 $\pm$ 0.46	1145 $\pm$ 0.446			
			288.5 $\pm$ 0.371	294.4 $\pm$ 0.54	1123 $\pm$ 0.545			
			306.9 $\pm$ 0.388		254.7 $\pm$ 0.413			
			320.6 $\pm$ 0.371		254.8 $\pm$ 0.461			
			313.3 $\pm$ 0.351		262.8 $\pm$ 0.602			
			336.7 $\pm$ 0.521					
			386.3 $\pm$ 0.545					
			391.9 $\pm$ 0.63					
<b>Tamanho (média <math>\pm</math> DP)</b>	252.811 $\pm$ 58.456	161.455 $\pm$ 13.502	301.377 $\pm$ 85.706	411.033 $\pm$ 128.386	753.280 $\pm$ 359.268	683.422 $\pm$ 156.684	466.677 $\pm$ 106.053	918.366 $\pm$ 108.915
<b>Pdl (média <math>\pm</math> DP)</b>	0.292 $\pm$ 0.0294	0.327 $\pm$ 0.094	0.419 $\pm$ 0.045	0.551 $\pm$ 0.052	0.53 $\pm$ 0.13	0.533 $\pm$ 0.08	0.496 $\pm$ 0.07	0.565 $\pm$ 0.031

Fonte: elaborado pelo autor.

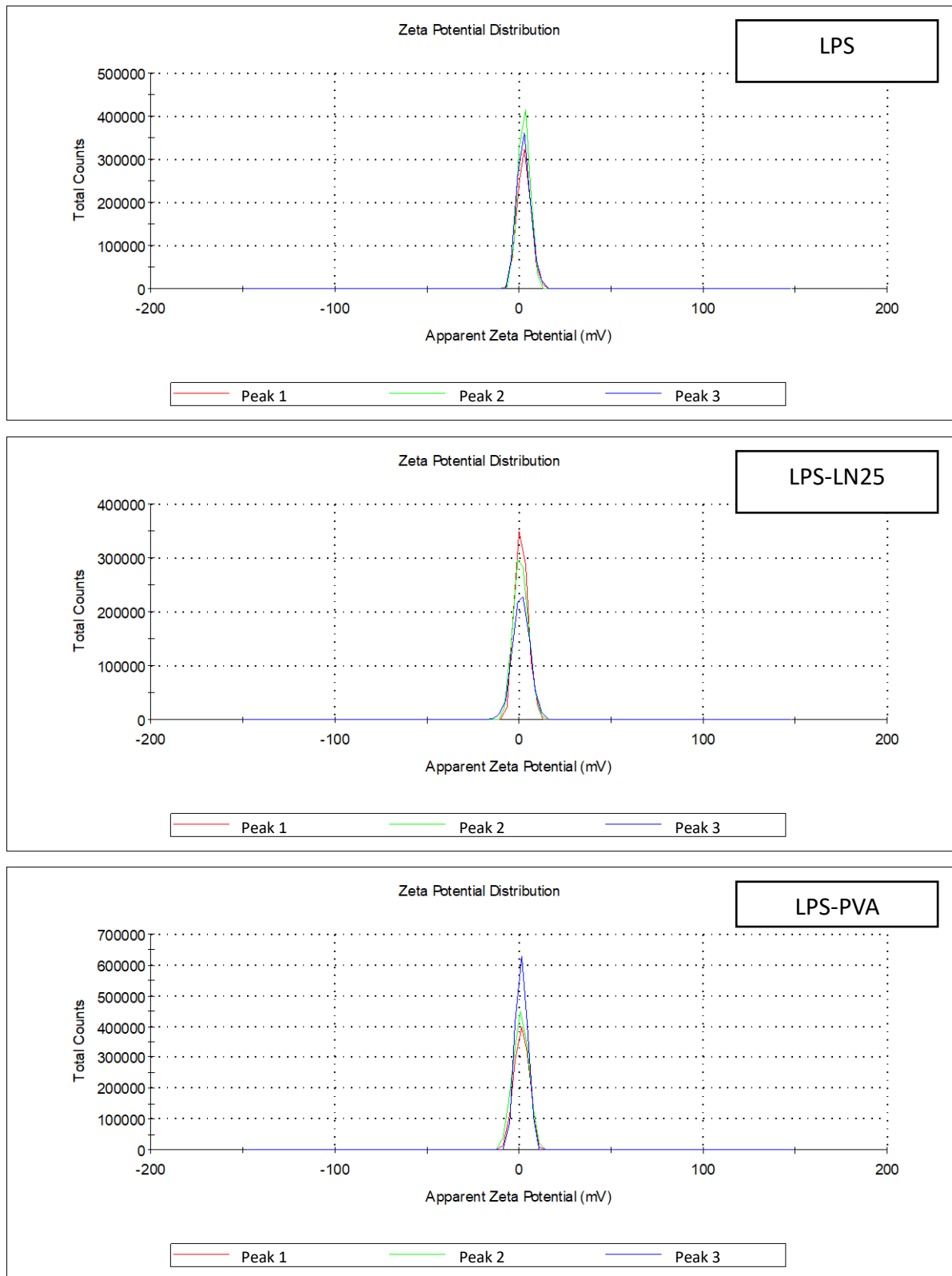
### 4.1.3. Potencial Zeta

O potencial zeta é uma propriedade fundamental que mede a carga elétrica presente na superfície de partículas coloidais, como lipossomas (CLOGSTON; PATRI, 2011). Sua medida fornece informações valiosas sobre a estabilidade de um sistema coloidal (HUNTER, 1988). Em sistemas coloidais e nanopartículas em suspensão, este é um importante parâmetro a ser avaliado (XU, 2008), a estabilidade é altamente influenciada pelas interações eletrostáticas entre as partículas.

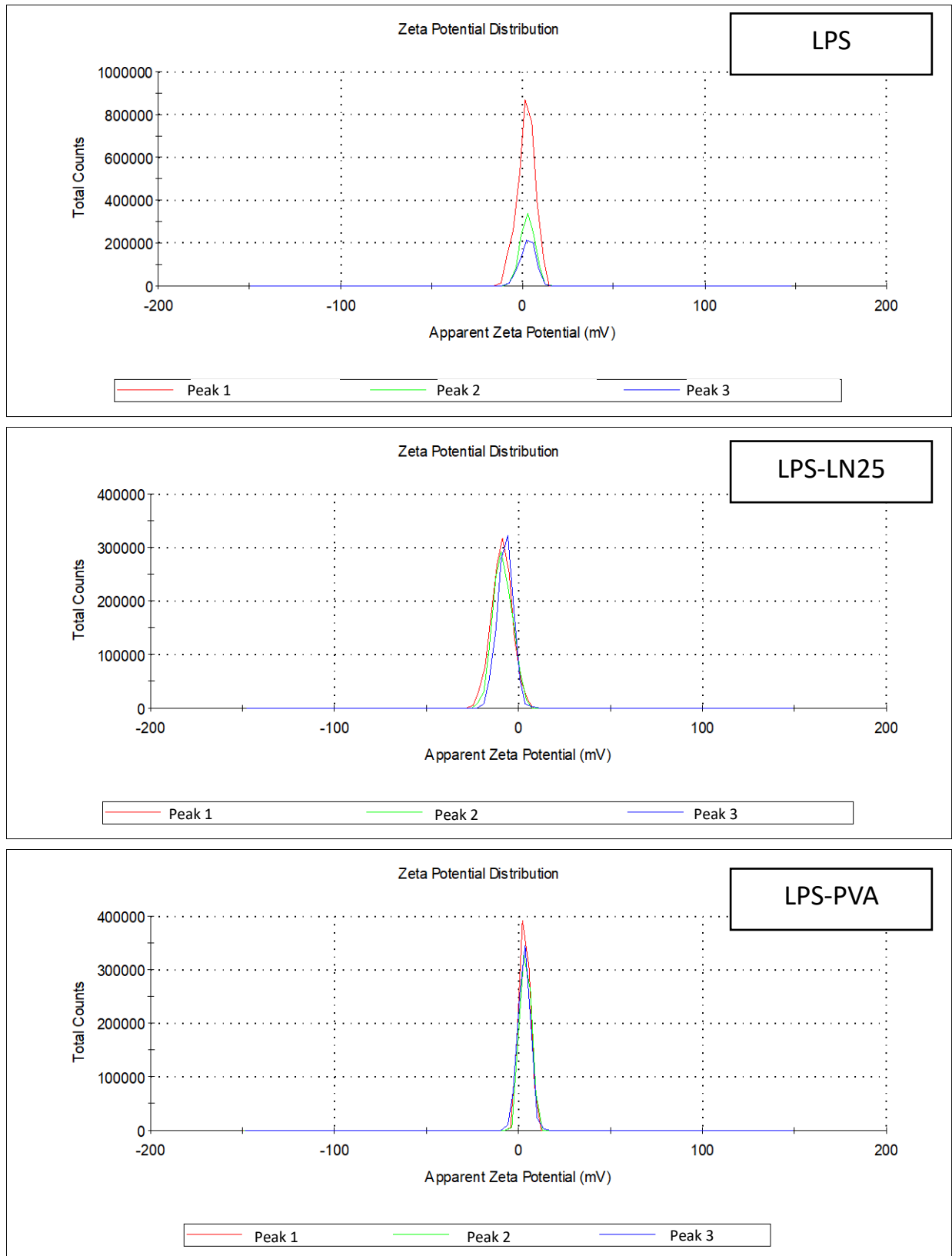
A determinação do potencial zeta é realizada utilizando técnicas como eletroforese, que mede a velocidade de migração das partículas sob a influência de um campo elétrico aplicado. Com base nesses dados, é possível calcular o potencial zeta, geralmente expresso em milivolts (mV).

Os resultados do Potencial Zeta para três preparações LPS, LPS-PVA e LPS-LN25 (com 25uL de LN adicionado no processo de síntese) para os dois pulsos aplicados estão presentes na Figura 20 e 21. Para todas as preparações os resultados do PZ permaneceram próximos de cargas neutras.

Quando o potencial zeta tem valores neutros, significa que as partículas coloidais estão eletricamente neutras na superfície. Nesse caso, não há uma carga elétrica significativa para gerar repulsão ou atração entre as partículas. A ausência de carga elétrica na superfície das partículas pode levar à falta de repulsão eletrostática entre elas, o que pode resultar em maior tendência para a aglomeração e agregação. Partículas coloidais com potencial zeta neutro têm maior probabilidade de se aproximarem e se unirem, formando agregados ou flocos maiores. Essa agregação pode levar à instabilidade coloidal, resultando em uma suspensão menos uniforme e mais suscetível a sedimentação.

**Figura 20.** Potencial Zeta pulso 59/15 (s/s)

Fonte: elaborado pelo autor.

**Figura 21.** Potencial Zeta das amostras de LPS, LPS-LN e LPS-PVA com pulso de 5/10 (s/s)

Fonte: elaborado pelo autor.

Para sistemas coloidais como lipossomas, é desejável que as partículas possuam um potencial zeta com valor significativo (positivo ou negativo) para manter uma boa estabilidade coloidal. Valores positivos de potencial zeta indicam uma superfície carregada positivamente, enquanto valores negativos indicam uma superfície carregada negativamente. Essas cargas elétricas ajudam a repelir as partículas umas das outras, prevenindo sua aglomeração e mantendo a suspensão estável.

Dados semelhantes com lipídios neutros como o usado neste trabalho foram relatados na literatura (MARITIM; BOULAS; LIN, 2021).

No caso de serem utilizadas em sistemas coloidais, resultados ideais para assegurar a estabilidade do sistema estariam abaixo de  $-30\text{mV}$  e acima de  $+30\text{mV}$  (LU *et al.*, 2014). Uma vez que a composição dos lipossomas é um parâmetro chave para o zeta potencial (GUIMARÃES; CAVACO-PAULO; NOGUEIRA, 2021), a adição de lipídios e outros ligantes carregados poderia trazer melhores resultados em estudos futuros.

Entretanto, é interessante destacar que, embora nossos resultados apresentem cargas neutras, os lipossomas estudados podem não sofrer as desvantagens elencadas uma vez que as preparações finais foram incorporadas em uma matriz de LN, ou seja, fora de suspensão coloidal.

#### **4.1.4. Morfologia dos lipossomas**

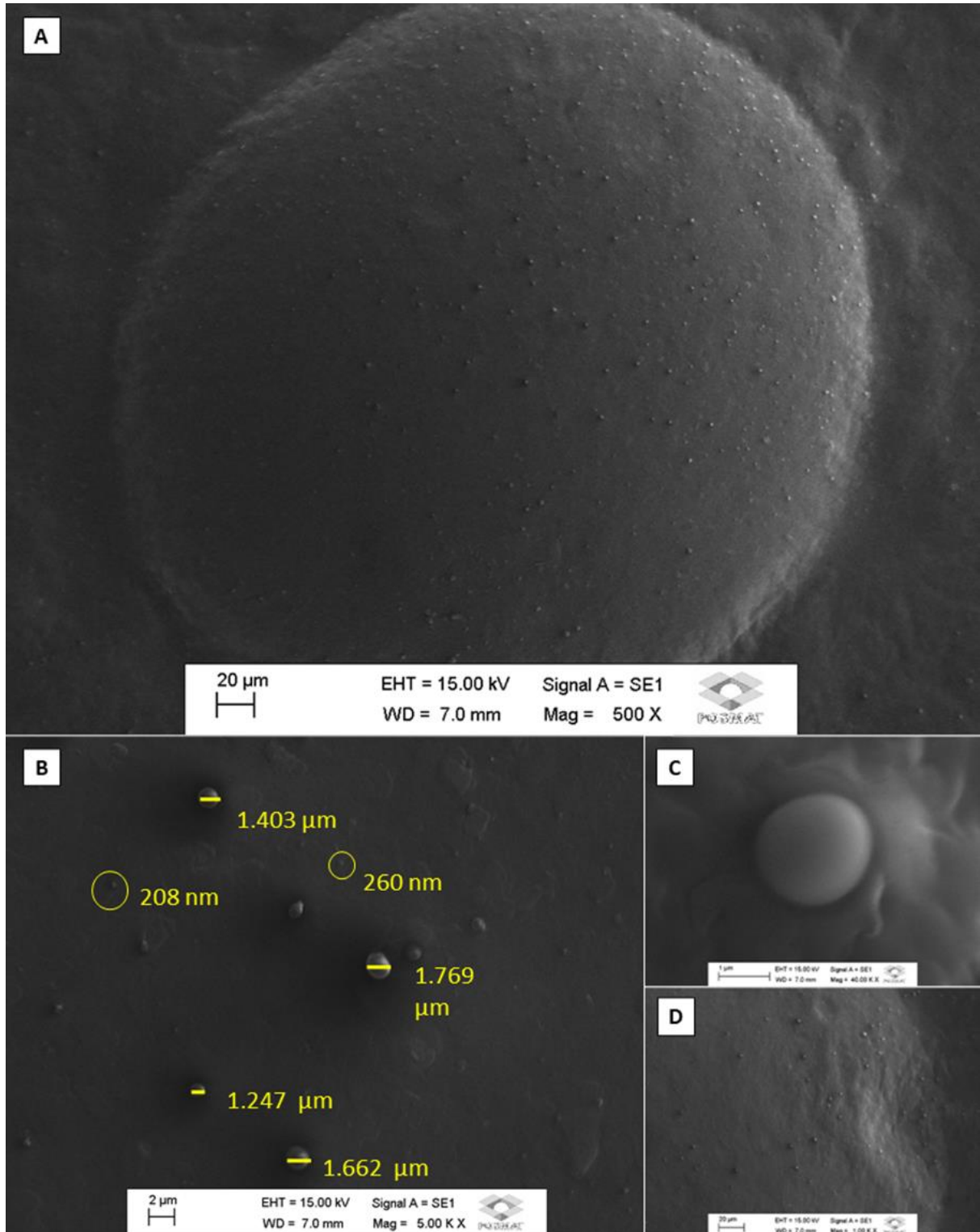
As microestruturas das nanopartículas LPS-AT, LPS-AT-LN e LPS-AT-PVA foram analisadas por meio do MEV. As imagens obtidas estão representadas na Figura 22, 23 e 24, respectivamente.

As LPS-AT apresentaram morfologia (Figura 22A) muito similar a outros estudos acerca lipossomas encontrados da literatura (AMNUAIKIT *et al.*, 2018; CHORACHOO; AMNUAIKIT; VORAVUTHIKUNCHAI, 2013; TIAN *et al.*, 2018). Entretanto, diâmetros não homogêneos foram identificados (Figura 22B), o que pode sugerir uma agregação dos lipossomas durante o processo de preparo do material para esta determinada análise. Resultados divergentes comparados às medidas de Tamanho de Partícula no ZetaSizer Nano podem também decorrer de imprevisibilidades durante as preparações das amostras para serem analisadas no MEV. Uma vez que é necessário a secagem das amostras para que sejam submetidas às condições de vácuo no equipamento, a estrutura das nanopartículas podem ter sido prejudicadas (SOPYAN; INSAN SUNAN; GOZALI, 2020). Entretanto, ainda é possível realizar algumas análises e coletar importantes informações com essa técnica sobre a morfologia e tamanho das vesículas. Dessa forma, foi possível identificar o formato esférico bem evidente nas LPS-AT (Figura 22C e 22D). A Figura 23, por sua vez, apresenta as estruturas das LPS-AT-LN. Houve a incidência de estruturas muito distintas (Figura 23A) quando comparadas com as LPS-AT, sendo possível identificar aspecto alongados de forma que sugere elasticidade na estrutura, devido provavelmente à adição do LN na formulação. Estruturas esféricas foram também identificadas (Figura 23B) em mais de uma região da mesma amostra (Figura 23C), bem como elementos na superfície similares às encontradas nas LPS-AT (Figura 23D), com agregados. Estruturas esféricas próximas a regiões alongadas também foram encontradas (Figura 23E).

Quanto às LPS-AT-PVA, foi possível identificar na Figura 24A diversos agregados na superfície também de morfologia esférica. Na Figura 24B e 24C as regiões analisadas estão em maiores aumentos e, embora não tenham uma resolução

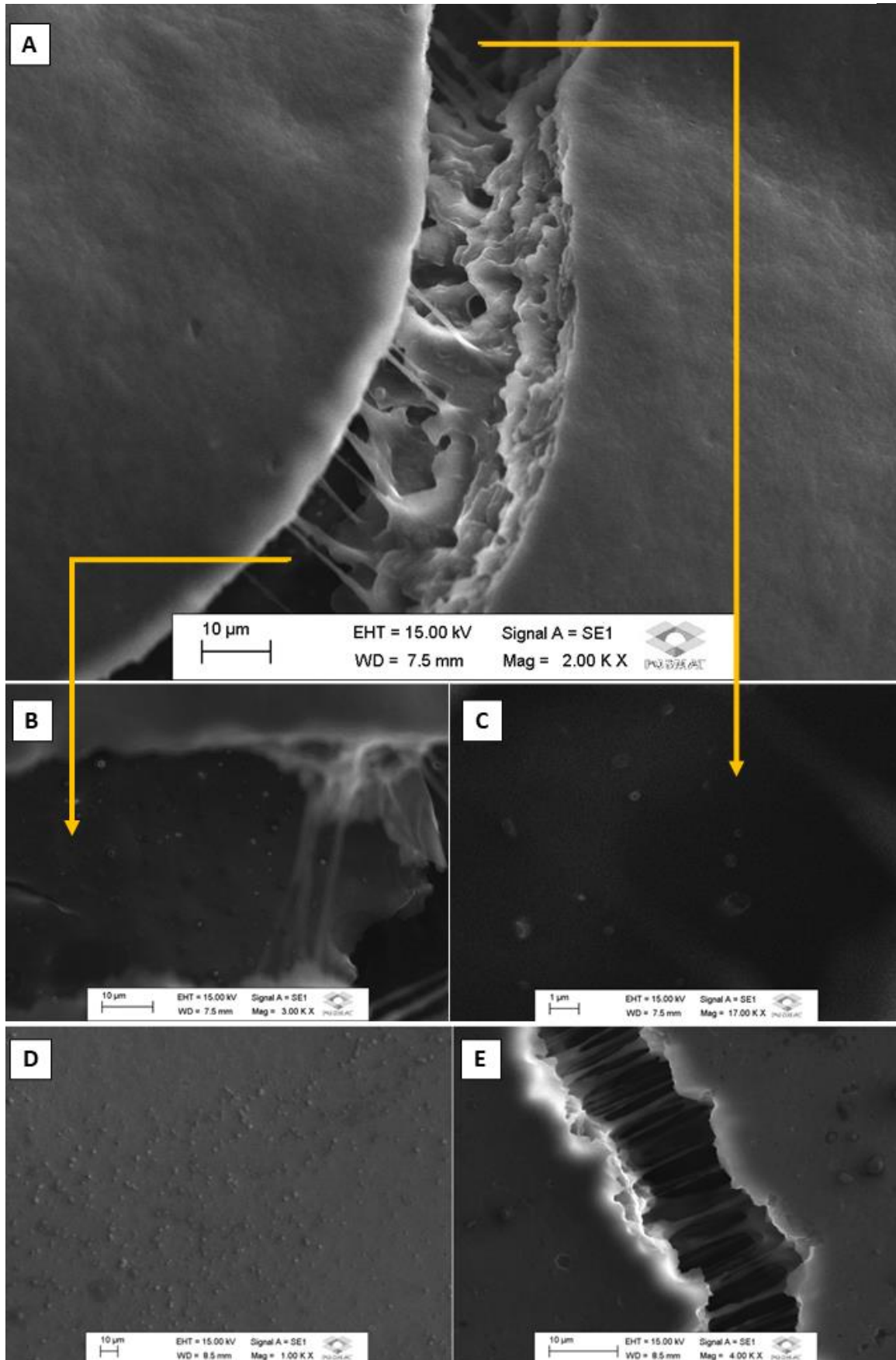
nítida, trazem em melhores detalhes o formato dos lipossomas e a formação de agregados decorrente da secagem da amostra. Esses resultados obtidos são vantajosos e corroboram com outros resultados da literatura que avaliam a morfologia por meio do MEV (DAVE *et al.*, 2019; RAMLI *et al.*, 2021). Dessa forma, mesmo com as limitações dessa técnica, é possível identificar com estes resultados, que o método de preparação dos lipossomas foi eficaz. A avaliação da superfície das vesículas trouxe resultados satisfatórias acerca o formato, tamanho e distribuição das nanopartículas produzidas, sendo possível identificar não só as deformações das LPS-AT-LN, mas também os aspectos vantajosos na morfologia de todas as preparações.

**Figura 22.** Microscopia Eletrônica de Varredura das LPS-AT



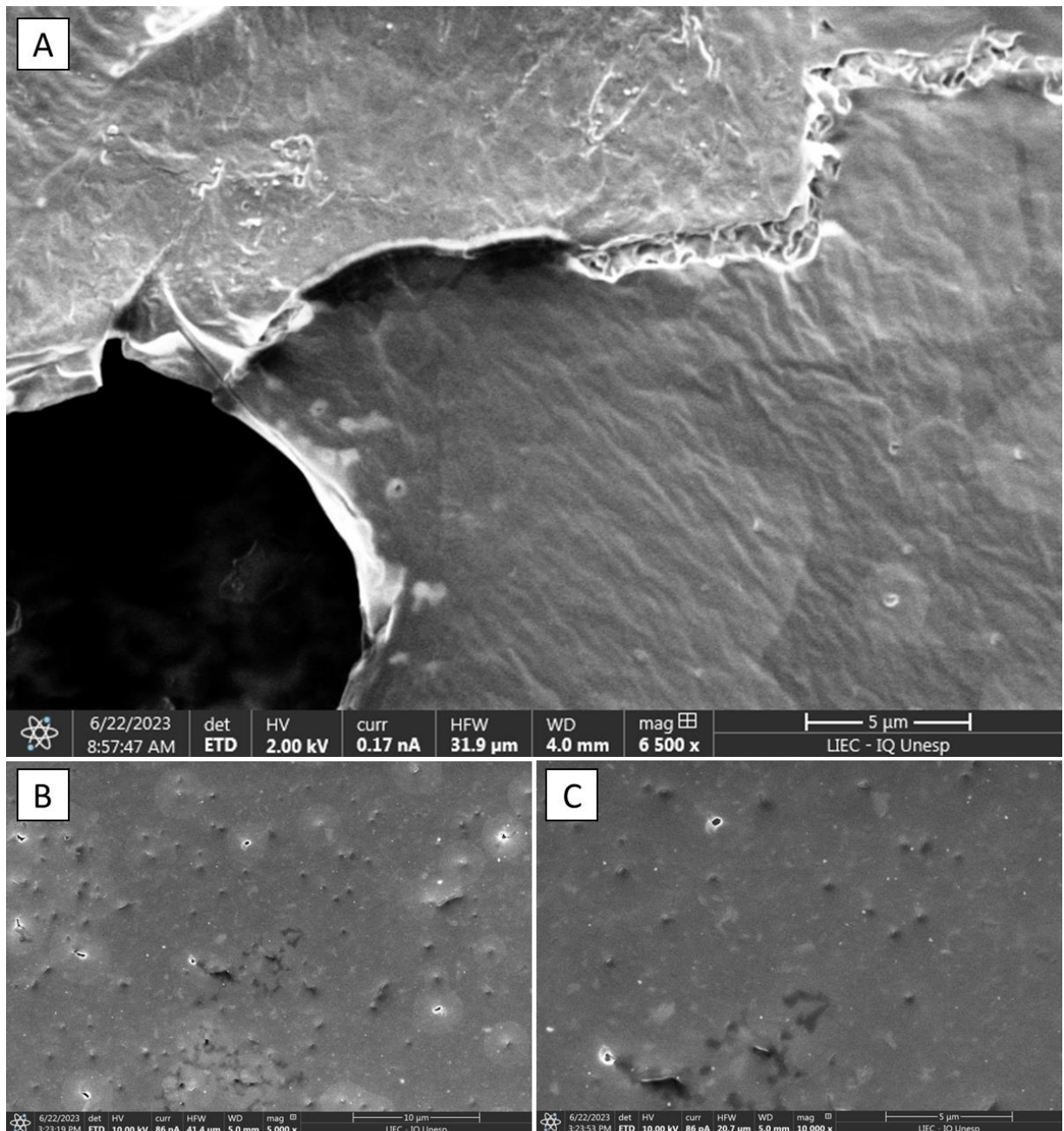
Fonte: elaborado pelo autor.

**Figura 23.** Microscopia Eletrônica de Varredura das LPS-AT-LN



Fonte: elaborado pelo autor.

**Figura 24.** Microscopia Eletrônica de Varredura das LPS-AT-PVA



Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.1.5 Análises das interações químicas por FTIR

Na Figura 25A é possível detectar duas regiões com maiores picos. As faixas características para o LN podem ser identificadas, principalmente  $3000\text{ cm}^{-1}$  para grupamentos CH, e picos com absorção na faixa próxima a  $1500\text{ cm}^{-1}$  também para CH. A tabela 3 traz as bandas de absorção relativas às principais regiões vibracionais

do cis-1,4-poli-isopreno, principal componente que forma o polímero da Borracha de LN, que correspondem às principais regiões identificadas na Figura 25A.

Para o PVA os picos identificáveis são CH na faixa de  $3000\text{ cm}^{-1}$  e na faixa de  $1400\text{ cm}^{-1}$ , e OH secundário próximo a  $1100\text{ cm}^{-1}$ . As faixas entre  $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ , que deveriam apresentar picos para grupamento OH característico do PVA, estão mascaradas pelo espectro da água, presente na solução de PVA preparada.

Para o Atenolol os picos que são possíveis de serem identificados são o de grupamentos de amida associada próximo do pico  $3350\text{ cm}^{-1}$  de menor intensidade, amina secundária NH próximo a  $3400\text{ cm}^{-1}$  e grupamento éter próximo a  $1200\text{ cm}^{-1}$ . Grupamentos de bandas médias na faixa de  $1550\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$  podem ser observados para aminas, além de grupamentos de hidrocarbonetos na faixa de  $1400\text{ cm}^{-1}$ .

No geral, os resultados para o LN corroboram com dados obtidos da literatura para os principais picos observados (AGOSTINI, 2009; FLORIANO *et al.*, 2018), assim como acontece com o PVA (MANSUR *et al.*, 2008; SUDHAMANI; PRASAD; UDAYA SANKAR, 2003) e o Atenolol (ERI *et al.*, 2014).

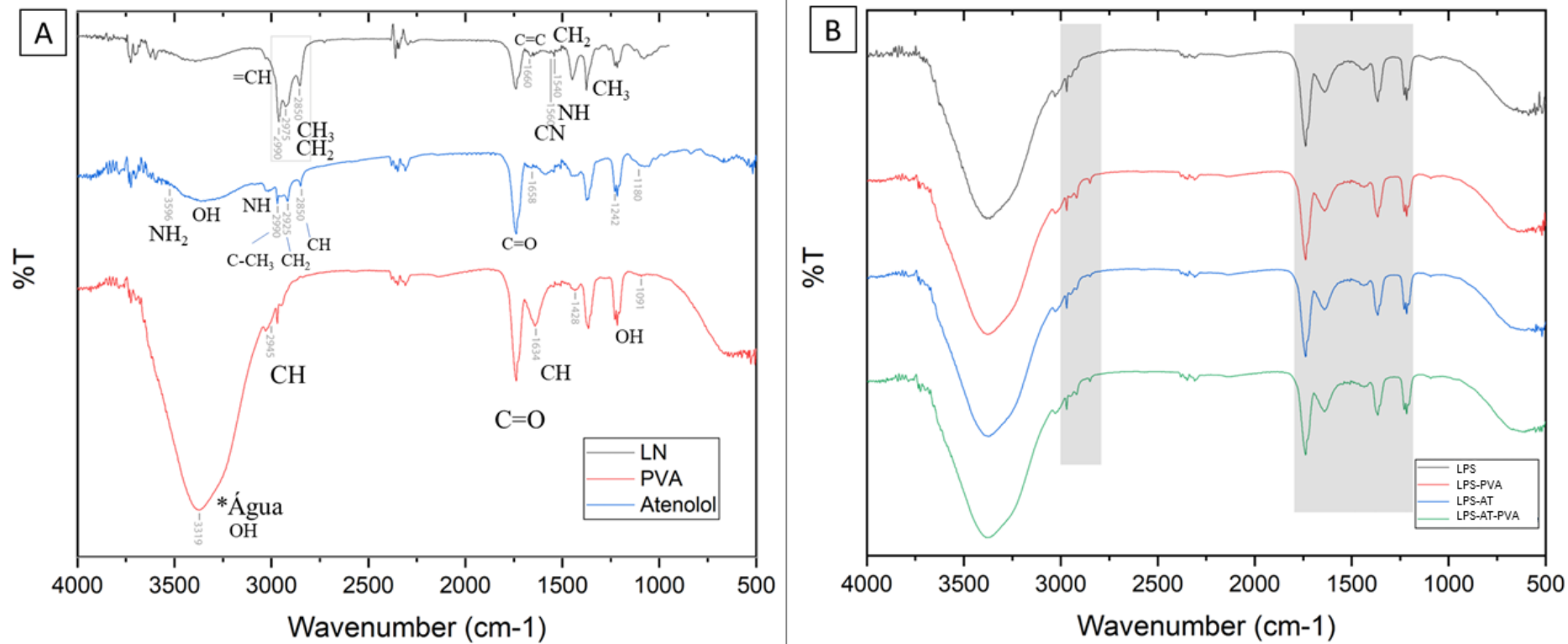
Os resultados para as preparações das nanopartículas estão demonstrados na Figura 25B para quatro preparações: LPS; LPS-PVA; LPS-AT e LPS-AT-PVA. Os resultados e identificação dos picos na Figura 25A são de grande auxílio para compreender como os componentes interagem nessas preparações. Destacam-se duas regiões principais com picos de absorção, que correspondem aos principais picos identificados na Figura 25A, demonstrando que as estruturas preparadas preservaram os principais picos que identificam cada componente utilizado, trazendo o entendimento de que não houve a degradação dos componentes durante o método de síntese ou interações significativas entre os componentes.

**Tabela 3.** Principais modos vibracionais do cis 1,4-poli-isopreno

Literatura	Atribuição (HEALEY; HENDRA; WEST, 1996; SAUNDERS; SMITH, 1949)	Referência
3036	$\nu_s$ (=C-H)	(HEALEY; HENDRA; WEST, 1996; LU; HSU, 1987; NOR; EBDON, 2000; SAUNDERS; SMITH, 1949)
2996-2855	$\nu_s$ C-H no CH <sub>3</sub>	
2726	$\nu_s$ C-H no CH <sub>3</sub>	
1450	$\nu_s$ C-H no -CH <sub>2</sub> -	
1375	$\nu$ -CH <sub>2</sub> -C=(CH <sub>3</sub> )	
1309	$\delta$ -CH <sub>2</sub> -	
1244, 1125 ou 1128	$\delta_s$ -CH <sub>3</sub>	
837	-CH <sub>2</sub> - twist	
	-CH <sub>2</sub> - twist	
	$\delta$ C = C - H	

Fonte: adaptado de Agostini (2009).

**Figura 25.** Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

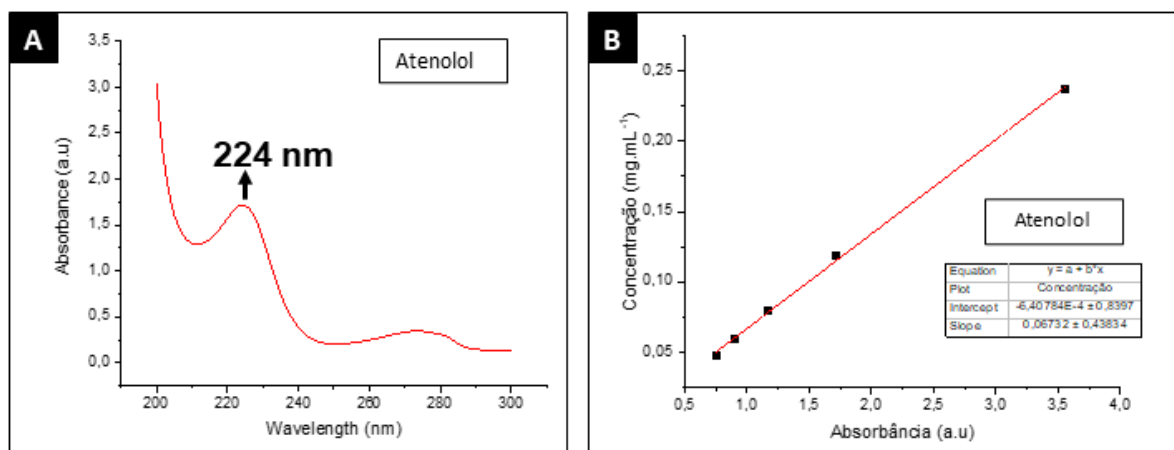


Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.1.6. Cinética de Liberação do Atenolol das nanopartículas

A Figura 26 mostra o espectro de absorvância do Atenolol (Figura 26A) e a intensidade da absorvância em função de diferentes concentrações do atenolol em solução aquosa (Figura 26B). Os resultados da cinética de liberação dos LPS-AT estão demonstrados na Figura 27A. Baseando-se na quantidade de droga inicial, tem-se que para as LPS-AT o percentual de droga liberada nas 140 horas avaliadas foi de 6,5-18,7% (Tabela 4). Para o estudo de cinética de liberação das LPS-AT-PVA (Figura 27B), foi possível identificar a liberação rápida nas primeiras horas, porém houve nas próximas horas a continuidade da liberação (liberação lenta). Isso sugere a liberação do conteúdo de fármaco ligado à superfície das nanopartículas primariamente, seguido da liberação do conteúdo interno, sendo possível identificar com esse resultado um perfil de liberação sustentada de fármaco. Para as LPS-AT o percentual de droga liberada no período avaliado foi de 18,8-22,6 % (Tabela 4).

**Figura 26.** Espectro do Atenolol em solução aquosa (A) e absorvância em função da concentração do atenolol em solução aquosa (B)



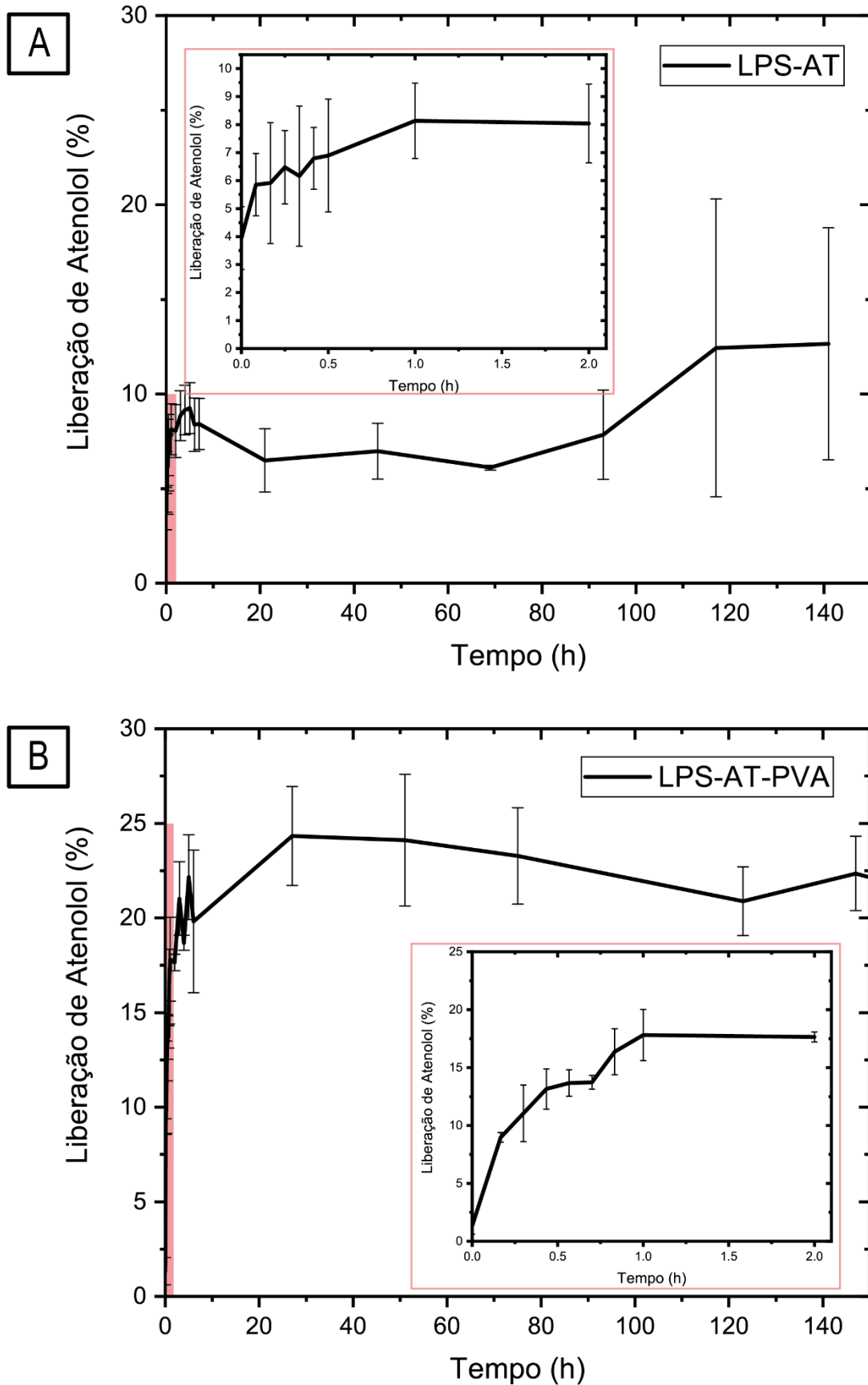
Fonte: elaborado pelo autor.

**Tabela 4.** Concentrações de droga inicial, droga liberada e taxa de liberação (%) nos testes de cinética de liberação *in vitro* da droga das nanopartículas

Amostra	Concentração Inicial (mg)	Concentração Liberada (mg)	% Liberada
LPS-AT	0,125	0,008-0,023	6,5-18,7
LPS-AT-PVA	0,125	0,023-0,028	18,8-22,6

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 27. Avaliação da Cinética de Liberação do Atenolol das LPS-AT e LPS-AT-PVA



Fonte: elaborado pelo autor.

Estudos de Chourasiya e colaboradores (2016) demonstram liberação de droga encapsulada na faixa entre 60 a 80% em 50 horas a depender da formulação utilizada. Outros estudos demonstraram a liberação de 80 a 90% em 350 horas avaliadas (ESTEBAN *et al.*, 2018) a partir de outras formulações para lipossomas. Todos os estudos comparados apresentaram a liberação rápida nas primeiras horas seguida de liberação lenta e sustentada.

Embora os resultados demonstrados não tenham sido acompanhados até maiores percentuais de liberação, é importante destacar que o perfil de liberação obtido foi similar aos estudos citados, com a liberação rápida e posteriormente, liberação lenta em 140 horas. Ademais, é interessante notar que as LPS-AT-PVA apresentaram maior liberação quando comparadas com as LPS-AT. Em futuros estudos, maiores tempos (superior a 140 horas) poderão ser avaliados para verificar se há um aumento no percentual de liberação, bem como novas técnicas poderão ser aliadas aos testes de liberação a fim de verificar o comportamento das moléculas encapsuladas nas nanopartículas. A espectroscopia Raman poderá ser uma importante aliada nesta investigação uma vez que permite avaliar compostos químico e estruturalmente e monitorar de forma quantitativa as concentrações de moléculas em amostras em condições *in vivo* e *in vitro* (MASUI *et al.*, 2022)

Por conta do tamanho e morfologia discrepante das LPS-AT-LN comparado às demais estruturas, para a pretendida aplicação, os experimentos de cinética de liberação não foram avaliados.

#### **4.2. Caracterização dos Dispositivos**

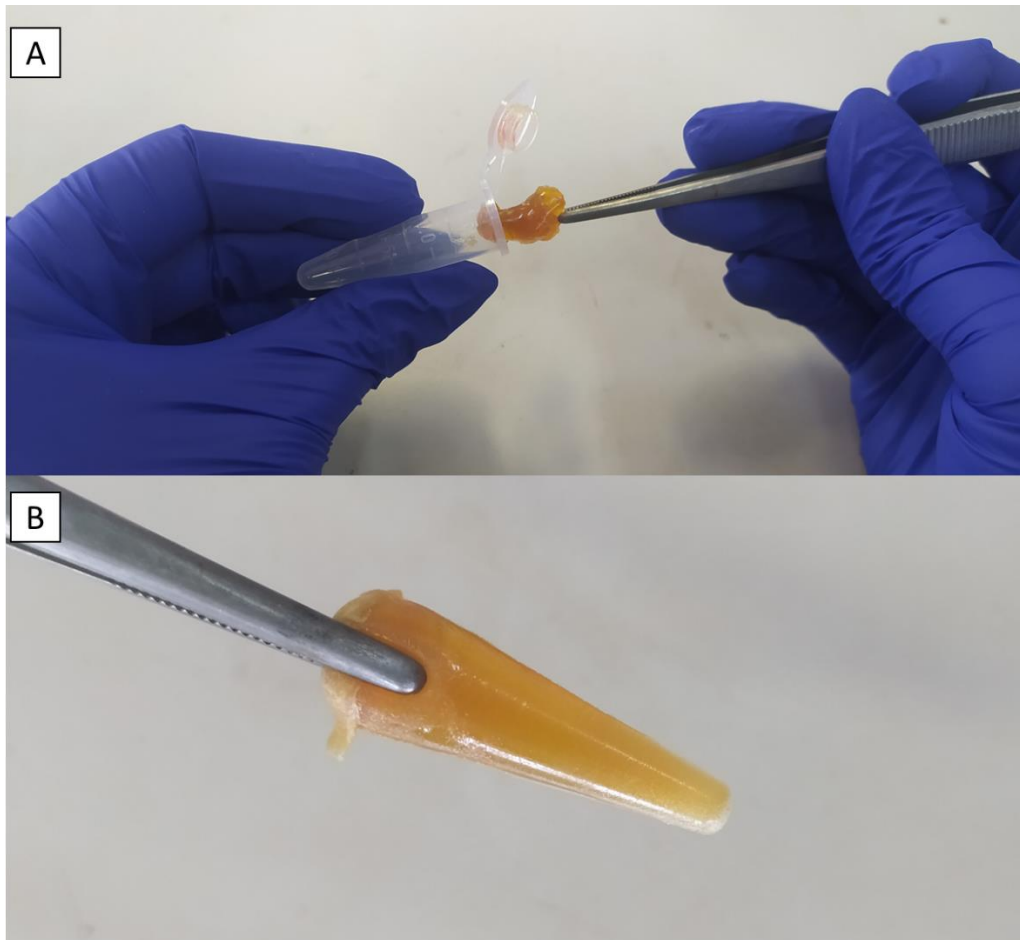
Esta seção traz os resultados acerca do dispositivo desenvolvido. As nanopartículas LPS-AT e LPS-AT-PVA foram incorporadas na matriz de LN.

As LPS-AT-LN, devido aos resultados insatisfatórias não foram testadas no dispositivo.

A Figura 28A traz uma foto do dispositivo pós-polimerização sendo retirado do *ependorf* utilizado como molde, enquanto que na Figura 28B é possível observar em melhores detalhes o dispositivo formato já com os lipossomas incorporados. Diversos modelos de dispositivos foram relatados na literatura, principalmente no formato de membranas (BARROS *et al.*, 2015; FLORIANO *et al.*, 2018; GUERRA *et al.*, 2021; HERCULANO *et al.*, 2009). No caso deste estudo o formato cônico foi o escolhido pela semelhança com a anatomia feminina e para facilitar futuras investigações deste dispositivo em modelos animais *in vivo*.

O dispositivo desenvolvido foi testado quanto às suas características morfológicas na superfície e *bulk*, interação entre as moléculas pelo FTIR, testes de avaliação de resistência mecânica por tração até a ruptura e testes de cinética de liberação do fármaco. Os resultados serão mostrados e discutidos nos tópicos seguintes.

**Figura 28.** Dispositivo após processo de polimerização (A) Retirada do dispositivo do *eppendorf* (molde) e (B) foto aproximada com detalhes do dispositivo

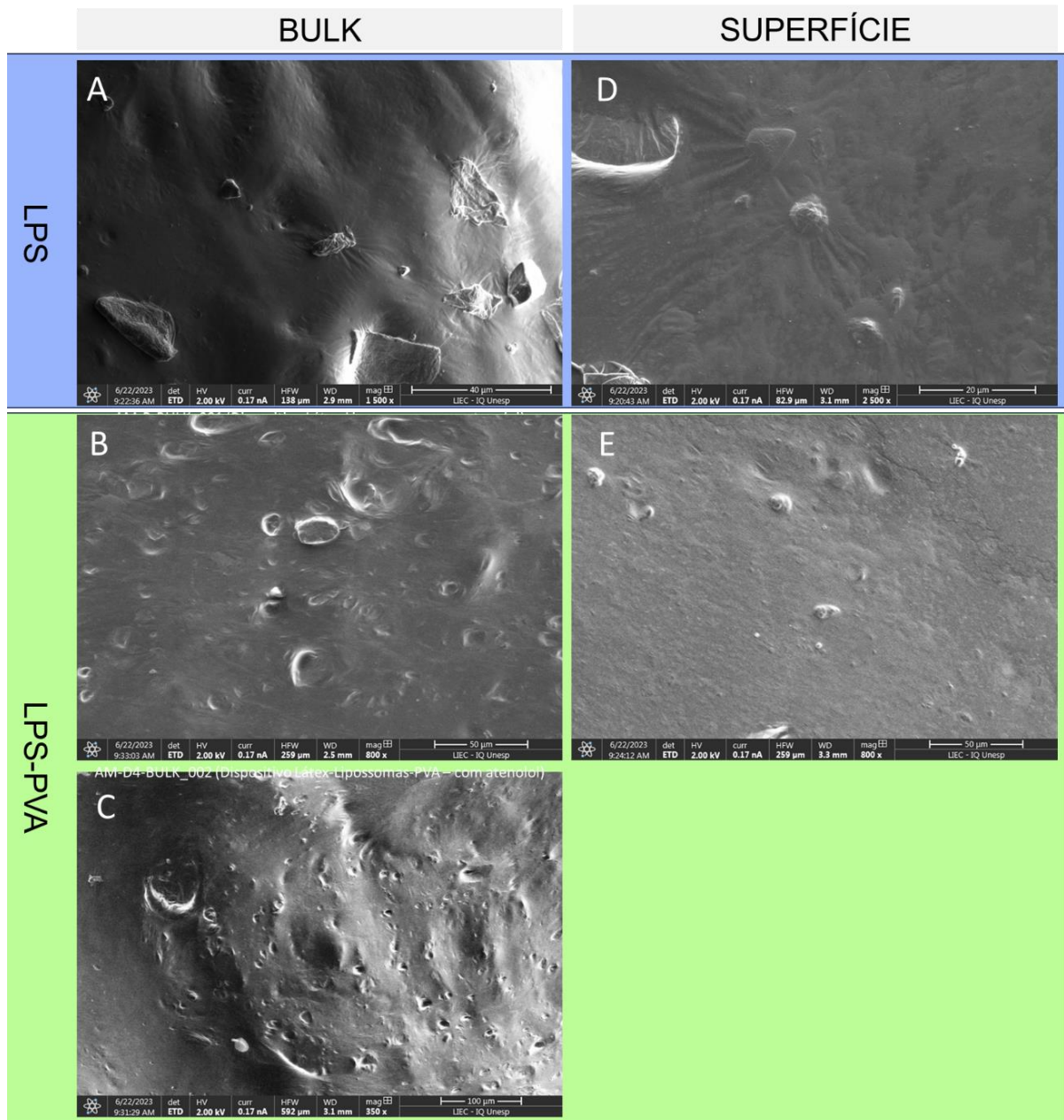


**Fonte:** elaborado pelo autor.

#### 4.2.1 Morfologia da superfície e do *bulk* dos dispositivos

A Figura 29 traz os resultados do MEV para a superfície e interior dos dispositivos. Os dispositivos contendo LPS-AT-PVA apresentam maior rugosidade e porosidade (29B e 29C) no *bulk* quando comparados com os dispositivos contendo LPS-AT (29A). Comparando-se a superfície dos dispositivos (29D e 29E) não é possível notar grandes diferenças entre os modelos. Podem ser notadas partículas, possivelmente provenientes da borracha, na superfície de ambas as preparações, além de partículas de menores dimensões que poderiam se tratar de nanopartículas presentes também na superfície.

**Figura 29.** MEV da superfície e do *bulk* dos dispositivos incorporados com LPS-AT e LPS-AT-PVA



**Fonte:** elaborado pelo autor.

Resultados similares podem ser encontrados nos estudos de Herculano e colaboradores (2009) que analisaram a superfície de membranas de LN para uso em sistemas de liberação de drogas para regeneração óssea. A porosidade observada

em seus estudos foi similar ao resultado obtido para os dispositivos LPS-AT-PVA (Figura 24C). Estes resultados também são corroborados pelos estudos de Barros e colaboradores (2016) que desenvolveram uma membrana de LN para entrega sustentada contendo peptídeos.

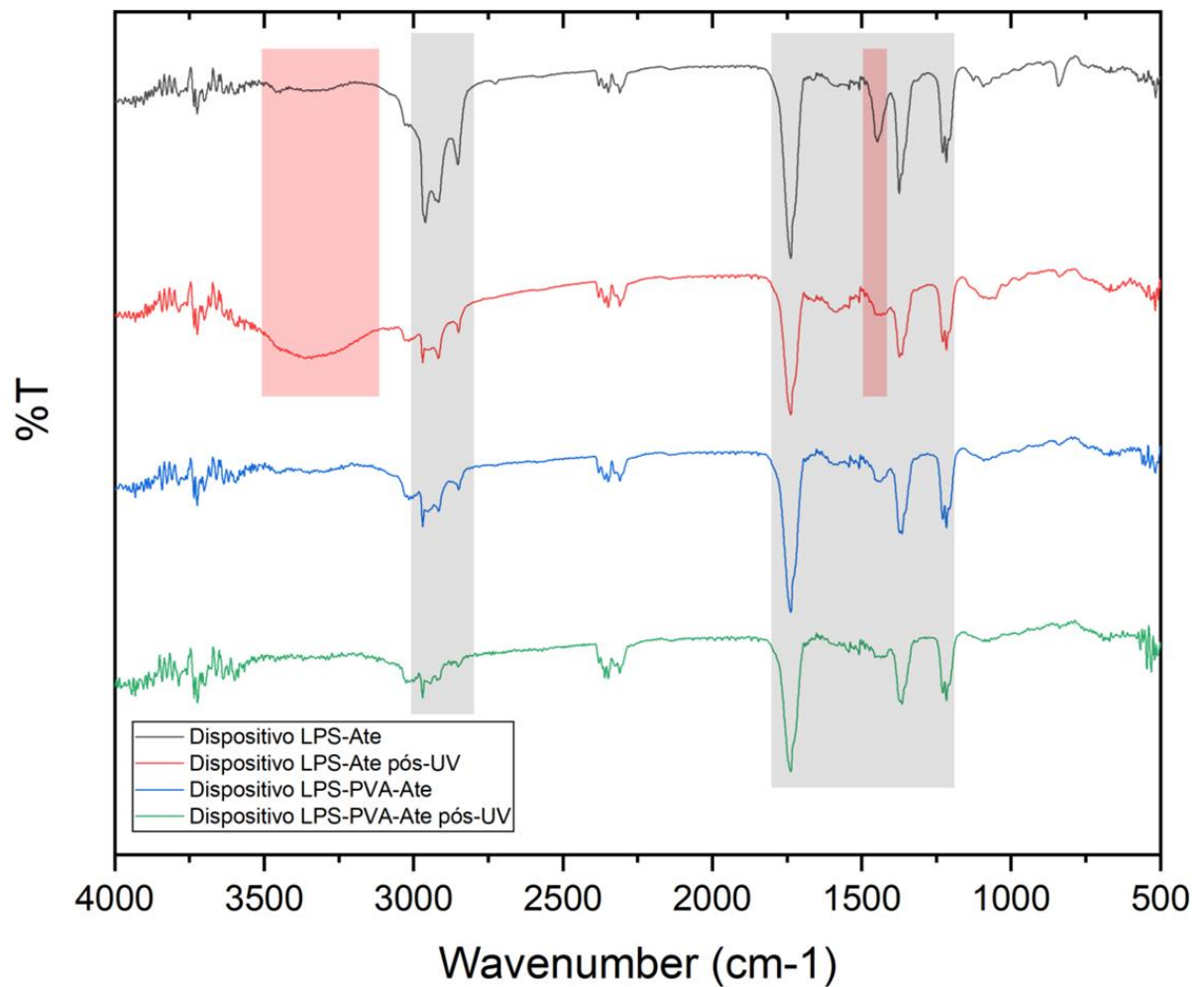
A porosidade observada nos dispositivos preparados é um importante fator que contribui de modo positivo para a liberação sustentada da droga. No tópico 4.2.4 avaliamos a cinética de liberação e comparamos com os achados obtidos pelo MEV.

#### **4.2.2 Integridade das ligações químicas do dispositivo e análise da influência da Luz-UV**

Analisando-se comparativamente o FTIR dos dispositivos (Figura 30) com os dados anteriores (Figura 25) do tópico 4.1.5, é possível identificar que o atenolol não interage quimicamente com o LN ou com os lipossomas. Há uma grande preservação dos picos observada a partir dos dados não tratados com luz-UV.

Comparando-se as preparações com relação a influência da luz-UV duas grandes modificações no padrão de absorção podem ser observadas. A primeira (identificada pela faixa rosa à esquerda), na faixa de 3100-3500  $\text{cm}^{-1}$  pode se tratar de modificações relacionadas a evaporação da água (com picos de absorção presentes para este intervalo), enquanto que a segunda faixa (à direita) apresenta picos menos intensos para regiões de CH presentes na maioria das moléculas presentes nas preparações. Maiores investigações, entretanto, são necessárias para afirmações assertivas sobre a ocorrência identificada.

**Figura 30.** FTIR dispositivos antes e após processo de esterilização por luz-UV



Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.2.3 Resistência Mecânica

Os testes de resistência mecânica são essenciais para avaliar a durabilidade e propriedades físicas de dispositivos baseados em polímeros e identificar e garantir que os dispositivos sejam suficientemente resistentes para suportar as condições às quais serão submetidos durante o uso clínico, garantindo a segurança e eficácia do produto.

Foram avaliadas membranas de LN, membranas contendo LPS e membranas contendo LPS-PVA. As membranas foram submetidas a testes de tração, com

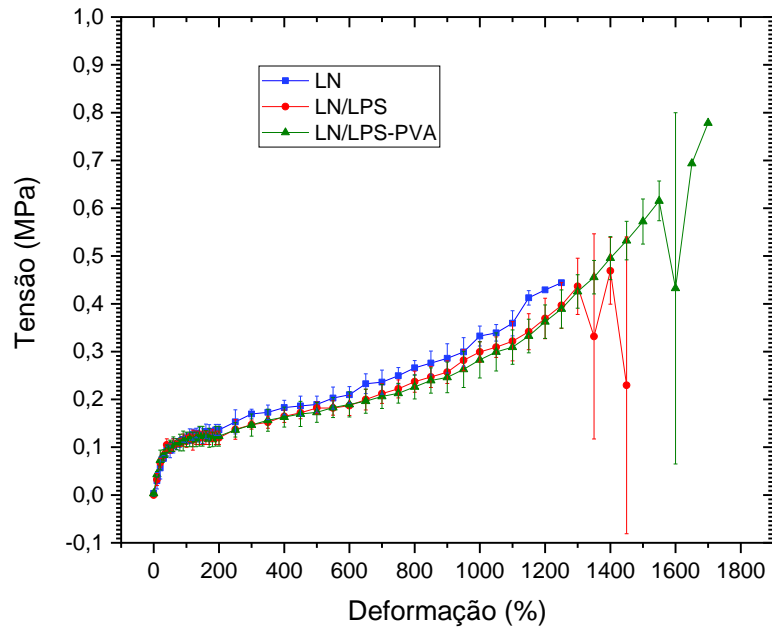
medição da força e da deformação quando submetido a uma carga de tensão. As membranas foram alongadas progressivamente até o ponto de ruptura.

Os resultados da curva tensão *versus* deformação para as membranas preparadas se encontram na Figura 31. As amostras não apresentaram grandes diferenças para o aumento da tensão quando submetidas aos testes de carga. Apenas foi possível identificar uma maior tendência das membranas LN/LPS-PVA em suportar o estiramento comparada às demais membranas. As membranas de LN produzidas por SILVA (2023) apresentaram maiores valores para tensão, porém sofreram ruptura em menores valores para a deformação.

Os resultados na Tabela 5 demonstram valores baixos para o módulo de Young em todas as preparações. As membranas desenvolvidas se mostraram também mais resistentes ao estiramento comparadas a trabalho que utiliza o fármaco escopolamina diretamente na matriz do LN (MORISE *et al.*, 2019) e resultados similares para a carga aplicada quando adicionado cetoprofeno na matriz do LN (FLORIANO *et al.*, 2018).

De forma geral, as composições não influenciaram as membranas quanto tensão aplicada e poucas diferenças foram constatadas. Os resultados da literatura encontrados corroboram os achados neste estudo acerca o comportamento característico do elastômero. Também foi possível detectar que as amostras tiveram baixo desvio padrão na Figura 31, o que representa boa reprodutibilidade e uniformidade.

**Figura 31.** Curva tensão-deformação das membranas de LN puras e com adição de nanopartículas LPS e LPS-PVA



Fonte: elaborado pelo autor.

**Tabela 5.** Valores de deformação até ruptura, tensão e módulo de Young para as membranas preparadas

Amostra	Deformação até ruptura (%)	Tensão (MPa)	Módulo de Young (MPa)
LN	1233±76.37	0.4491±0.0346	0.0024±0.0010
LN/LPS	1500±270.80	0.5913±270.8012	0.0035±0.0005
LN/LPS-PVA	1633±76.37	0.6952±0.0721	0.0034±0.0011

Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.2.4. Cinética de Liberação do Atenolol do dispositivo

A avaliação da cinética de liberação do atenolol foi realizada nos dispositivos contendo LPS-AT e LPS-AT-PVA.

É possível comparar a partir da Figura 32 que os dispositivos avaliados apresentaram menor liberação rápida do fármaco nas primeiras horas quando comparados às nanopartículas (item 4.1.6).

Ademais, o dispositivo LPS-AT-PVA apresentou melhores resultados em relação a liberação rápida em comparação com o dispositivo LPS-AT. É importante ressaltar ainda que há um grande desvio padrão no gráfico, devido principalmente ao método de incorporação das nanopartículas no dispositivo, realizada neste trabalho com um *pool* de LN e lipossomas submetidos a um banho de ultrassom, para posterior divisão entre os moldes. Ambos os dispositivos demonstraram liberação lenta nas horas subsequentes e a saturação não foi atingida nas 140 horas avaliadas, o que demonstra um excelente resultado quanto ao objetivo de se obter um dispositivo com liberação sustentada de drogas. A tabela 5 sintetiza o percentual de droga liberado para as amostras avaliadas. Os dispositivos LPS-AT e LPS-AT-PVA trouxeram percentual máximo da liberação do atenolol de 19,5% e 18,5% (Tabela 6), respectivamente. Estudos com maiores períodos de avaliação da liberação são indicados para melhor compreensão dessas taxas.

Resultados da literatura também evidenciam a liberação rápida de drogas adicionadas diretamente na matriz do LN (AIELO *et al.*, 2014; FLORIANO *et al.*, 2017; HERCULANO *et al.*, 2009). Entretanto, também evidenciaram maiores percentuais para a liberação de drogas encapsuladas diretamente na matriz do LN.

Estudos realizados com membranas de LN contendo outros tipos de nanopartículas também foram encontrados. Miranda e colaboradores (2022) avaliaram a liberação de metronidazol de nanopartículas de prata incorporadas em LN e obtiveram percentual de liberação na faixa de 27%.

A presença de poros observadas mediante os resultados do MEV nas matrizes de LN do dispositivo são um fator importante para a liberação. Almeida e colaboradores (2020) tiveram sucesso ao avaliarem o impacto da fabricação de microporos em membranas de LN na liberação de drogas, obtendo uma liberação controlada de ciprofloxacina.

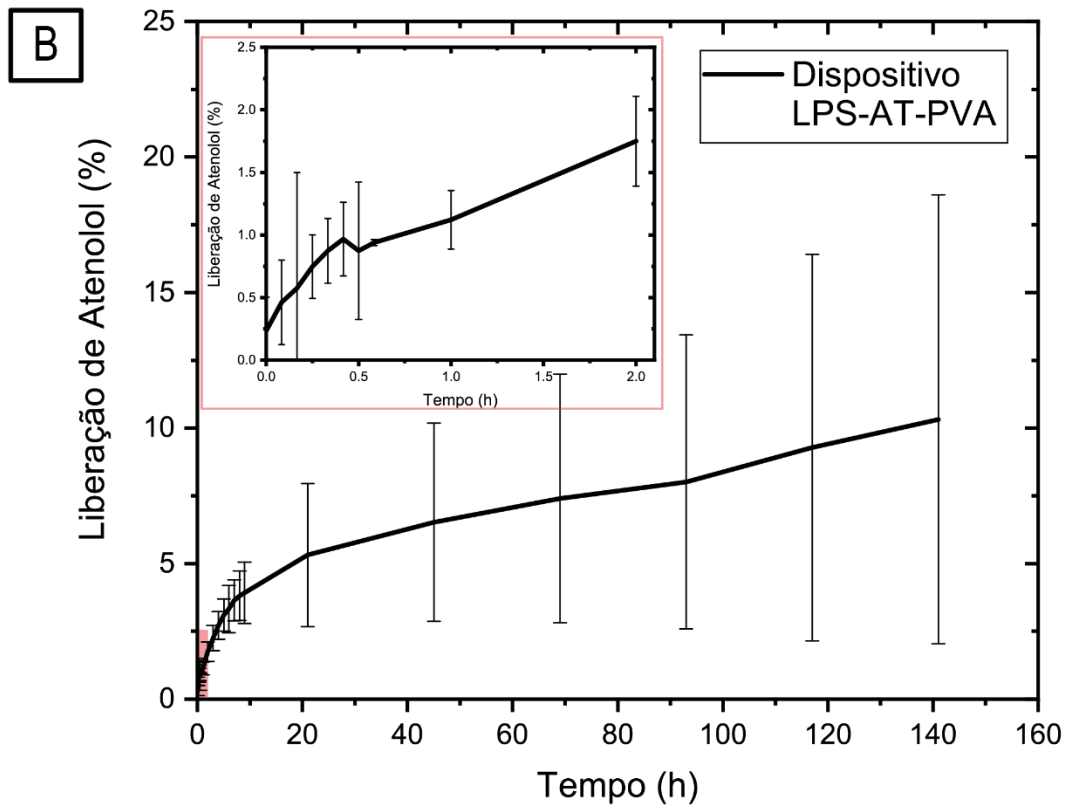
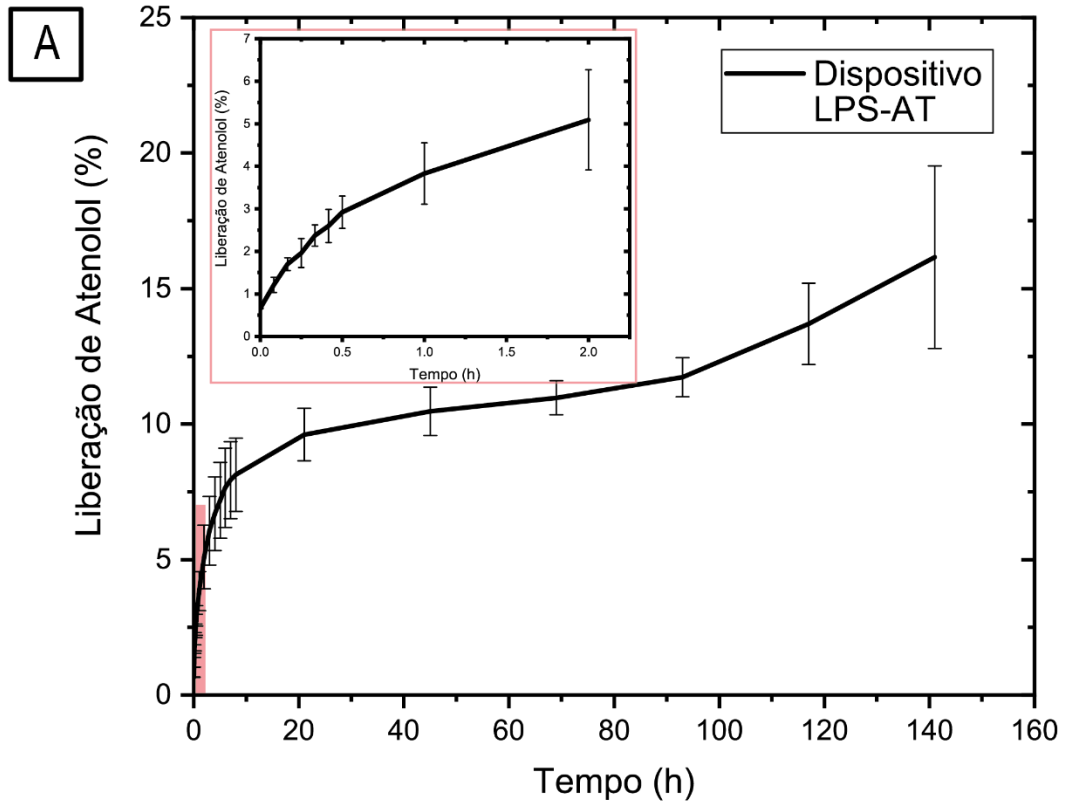
É importante ressaltar ademais que o dispositivo LPS-AT-PVA apresentaram uma importante vantagem comparada ao dispositivo LPS-AT, uma vez que apresenta menor liberação rápida nas primeiras horas, o que pode trazer grandes perspectivas para maiores investigações desse modelo desenvolvido.

**Tabela 6.** Concentrações de droga inicial, droga liberada e taxa de liberação (%) nos testes de cinética de liberação in vitro da droga dos dispositivos

Amostra	Concentração Inicial (mg)	Concentração Liberada (mg)	% Liberada
Dispositivo -LPS	1	0.128-0.195	12,7-19,5%
Dispositivo -LPS-PVA	1	0.020-0.186	2-18,5%

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 32.** Avaliação da Cinética de Liberação do Atenolol dos dispositivos de LN contendo LPS e LPS-PVA



Fonte: elaborado pelo autor.

# 5 Considerações Finais

## 5 Considerações Finais

Este estudo demonstrou que a funcionabilidade de lipossomas pode ser melhorada com a adição do biopolímero PVA na síntese, trazendo vantagens para aplicação desses sistemas em dispositivos que visam uma liberação sustentada de drogas. A incorporação do fármaco nas nanopartículas foi possível por meio do método de ultrasonicação, bem como a síntese dos dispositivos com a incorporação das LPS-AT e LPS-AT-PVA nas matrizes de LN. A morfologia avaliada mediante a MEV das nanopartículas demonstrou formato esférico para todas as estruturas investigadas e por meio do Analisador de Tamanho de Partículas foi possível verificar um diâmetro hidrodinâmico adequado e uniformidade no tamanho para aplicação em formulações farmacológicas. As LPS-PVA revelaram menores tamanhos de nanopartículas dentre as preparações avaliadas e, junto às LPS, foram as melhores estruturas em relação ao tamanho para serem utilizadas no sistema de entrega de drogas pretendido. Analisando-se a liberação do fármaco atenolol, foi identificado que tanto os lipossomas LPS-AT e LPS-AT-PVA, quanto os dispositivos LPS-AT e LPS-AT-PVA exibiram um perfil de liberação sustentada e exibiram ótimos resultados comparando-se com outros dispositivos na literatura, sendo que os dispositivos exibiram melhor controle para evitar a liberação rápida comparada aos lipossomas sem a matriz de LN. O perfil de liberação sustentada de fármaco demonstrado tem grande relação com as propriedades físicas da matriz de LN, em especial a porosidade verificada com auxílio da MEV. Os dispositivos avaliados apresentaram bons resultados para o fármaco avaliado e trouxeram a otimização esperada por meio do maior controle da liberação com a incorporação dos lipossomas na matriz de LN. Os lipossomas e os dispositivos avaliados demonstraram integridade química e ausência de interações significativas entre seus componentes por meio da técnica de FTIR.

Todas as membranas avaliadas a partir de preparações contendo LN, LPS-AT e LPS-AT-PVA demonstraram valores baixos para módulo de Young e alto potencial de deformação, corroborando com as características próprias de elastômeros e sugerindo grandes perspectivas para o desenvolvimento de tratamentos confortáveis e que se adequem à anatomia do local de aplicação. Embora a taxa de liberação ainda não seja totalmente compreendida, sendo necessários maiores estudos com avaliação em maiores tempos para a cinética de liberação, há uma excelente perspectiva de aplicação dessa tecnologia em projetos futuros e maiores investigações para a expansão do entendimento das condições *in vitro* e *in vivo* do SVLTF e de novos modelos de dispositivo.

## Referências

- AD ASSOCIATION. Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, [S. l.], v. 45, n. Supplement\_1, p. S1–S2, jan. 2022.
- ADEPU, S.; RAMAKRISHNA, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. **Molecules**, [S. l.], v. 26, n. 19, p. 5905, 29 set. 2021.
- ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 593–623, abr. 1999.
- AGOSTINI, D. L. DA S. **Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese**. 2009. 87f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, 2009.
- AIELO, P. B. *et al.* Evaluation of sodium diclofenac release using natural rubber latex as carrier. **Materials Research**, [S. l.], v. 17, n. suppl 1, p. 146–152, fev. 2014.
- AJEESHKUMAR, K. K. *et al.* Advancements in liposome technology: Preparation techniques and applications in food, functional foods, and bioactive delivery: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 1280–1306, mar. 2021.
- AKBARZADEH, A. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, [S. l.], v. 8, n. 102, p. 1–9, 2013.
- ALDABE, D. *et al.* Pregnancy-related pelvic girdle pain and its relationship with relaxin levels during pregnancy: a systematic review. **European Spine Journal**, [S. l.], v. 21, n. 9, p. 1769–1776, set. 2012.
- ALMEIDA, G. F. B. *et al.* Controlled drug delivery system by fs-laser micromachined biocompatible rubber latex membranes. **Applied Surface Science**, [S. l.], v. 506, p. 144762, mar. 2020.
- ALVARENGA-MARTINS, N. *et al.* Incontinência Urinária: Uma análise à luz das políticas de envelhecimento. **Revista de Enfermería UFPE on line**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 1189–1199, 2017.
- AMNUAIKIT, T. *et al.* Vesicular carriers containing phenylethyl resorcinol for topical delivery system; liposomes, transfersomes and invasomes. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 472–484, set. 2018.
- ARAÚJO, G. T. B. DE. **O custo da incontinência urinária no Brasil - Experiência do serviço de Uroginecologia da UNIFESP**. 2009. 37f. Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ARIF, U. *et al.* Biocompatible Polymers and their Potential Biomedical Applications: A Review. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 25, n. 34, p. 3608–3619, 2019.

ASEMI, Z.; KARAMALI, M.; ESMALLZADEH, A. Effects of calcium–vitamin D co-supplementation on glycaemic control, inflammation and oxidative stress in gestational diabetes: a randomised placebo-controlled trial. **Diabetologia**, [S. l.], v. 57, n. 9, p. 1798–1806, set. 2014.

ASTM. **ASTM D412-16 Standard Test Methods for Vulcanized Rubber and Thermoplastic Elastomers —Tension**. [s.l.: s.n.]. 2016.

BARBA, A. A. *et al.* Ultrasonic energy in liposome production: process modelling and size calculation. **Soft Matter**, [S. l.], v. 10, n. 15, p. 2574, 2014.

BARBOSA, A. M. P. *et al.* Urinary incontinence and vaginal squeeze pressure two years post-cesarean delivery in primiparous women with previous gestational diabetes mellitus. **Clinics**, [S. l.], v. 66, n. 8, p. 1341–1345, 2011

BARROS, N. R. *et al.* Diclofenac Potassium Transdermal Patches Using Natural Rubber Latex Biomembranes as Carrier. **Journal of Materials**, [S. l.], v. 2015, p. 1–7, 2015.

BARROS, N. R. *et al.* Oxytocin Sustained Release Using Natural Rubber Latex Membranes. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 435–444, 1 dez. 2016.

BEHNKE, J. *et al.* MSC Based Therapies—New Perspectives for the Injured Lung. **Journal of Clinical Medicine**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 682, 3 mar. 2020.

BELLAMY, L. *et al.* Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, [S. l.], v. 373, n. 9677, p. 1773–1779, mai. 2009.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. Fifth Edit ed. [S.l.: s.n.]. 2002.

BILODEAU, C. *et al.* Limitations of recellularized biological scaffolds for human transplantation. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. [S. l.], v. 14, n. 3, p. 521–538, mar. 2020.

BOOSTANI, S.; JAFARI, S. M. Controlled release of nanoencapsulated food ingredients. In: **Release and Bioavailability of Nanoencapsulated Food Ingredients**. [S. l.]: Elsevier, 2020. cap. 2, p. 27–78.

BORGES, F. A. *et al.* Metronidazole-loaded gold nanoparticles in natural rubber latex as a potential wound dressing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 211, p. 568–579, jun. 2022.

BOSETTI, R. Cost–effectiveness of nanomedicine: the path to a future successful and dominant market? **Nanomedicine**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 1851–1853, jul. 2015.

BOSETTI, R.; JONES, S. L. Cost–effectiveness of nanomedicine: estimating the real size of nano-costs. **Nanomedicine**, [S. l.], v. 14, n. 11, p. 1367–1370, jun. 2019.

BRUBAKER, L. *et al.* The impact of stress incontinence surgery on female sexual function. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 200, n. 5, p. 562.e1-562.e7, mai. 2009.

CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Materials Science and Engineering: An Introduction**. 10th. [S.l.: s.n.]. 2018.

CAM, M. E. *et al.* Evaluation of burst release and sustained release of pioglitazone-loaded fibrous mats on diabetic wound healing: An in vitro and in vivo comparison study. **Journal of the Royal Society Interface**, [S. l.], v. 17, n. 162, jan. 2020.

CHAMBERLAIN, G. *et al.* Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. **Stem Cells**, [S. l.], v. 25, n. 11, p. 2739–2749, nov. 2007.

CHEN, H. W.; CHANG, Y. W. Encapsulation of *Clitoria ternatea* extract in liposomes by synergistic combination of probe-type ultrasonication and high-pressure processing. **Journal of Food Safety**, [S. l.], v. 40, n. 6, 23 dez. 2020.

CHENG, C. *et al.* Improvement on stability, loading capacity and sustained release of rhamnolipids modified curcumin liposomes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 183, 1 nov. 2019.

CHORACHOO, J.; AMNUAIKIT, T.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Liposomal Encapsulated Rhodomyrtone: A Novel Antiacne Drug. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2013, p. 1–7, 2013.

CHOURASIYA, V.; BOHREY, S.; PANDEY, A. Formulation, optimization, characterization and in-vitro drug release kinetics of atenolol loaded PLGA nanoparticles using 3 3 factorial design for oral delivery. **Materials Discovery**, [S. l.], v. 5, p. 1–13, ago. 2016.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. **Zeta Potential Measurement**. In: [S.l.: s.n.]. p. 63–70. 2011.

COSTA, A. *et al.* Biologic Scaffolds. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. a025676, set. 2017.

D'SOUZA, D. M.; AL-SAJEE, D.; HAWKE, T. J. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 4, 2013.

D'SOUZA, D. M.; AL-SAJEE, D.; HAWKE, T. J. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 4, p. 1-7, 2013.

DAVE, V. *et al.* Synthesis and characterization of celecoxib loaded PEGylated liposome nanoparticles for biomedical applications. **Nano-Structures & Nano-Objects**, [S. l.], v. 18, p. 100288, abr. 2019.

DEEPAK, A.; GOYAL, A. K.; RATH, G. Nanofiber in transmucosal drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. [S. l.], Editions de Sante, , 1 fev. 2018.

DING, Q. *et al.* Preparation of nanocomposite membranes loaded with taxifolin liposome and its mechanism of wound healing in diabetic mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 241, p. 124537, jun. 2023.

- DISSARANAN, C. *et al.* Rat mesenchymal stem cell secretome promotes elastogenesis and facilitates recovery from simulated childbirth injury. **Cell Transplantation**, [S. l.], v. 23, n. 11, p. 1395–1406, 2014.
- DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 315–317, 1 jan. 2006.
- DUNN, A. *et al.* Biomaterial and stem cell-based strategies for skeletal muscle regeneration. **Journal of Orthopaedic Research**, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 1246–1262, jun. 2019.
- ERENO, C. *et al.* Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, [S. l.], v. 95, n. 3, p. 932–939, dez. 2010.
- ERI, G. K. *et al.* Novel FT-IR spectroscopic method for the quantitation of atenolol in bulk and tablet formulations. **Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 1750–1755, 2014.
- ESTEBAN, E. G. *et al.* A comparative study of stabilising effect and antioxidant activity of different antioxidants on levodopa-loaded liposomes. **Journal of Microencapsulation**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 357–371, mai. 2018.
- FAN, Y.; MARIOLI, M.; ZHANG, K. Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 192, p. 113642, jan. 2021.
- FARIA, C. A. *et al.* Effect of the type of urinary incontinence on the quality of life of patients in the public healthcare system in southeastern brazil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, [S. l.], v. 37, n. 8, p. 374–380, ago. 2015.
- FERREIRA, M. *et al.* Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. **Brazilian Journal of Physics**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 564–569, set. 2009.
- FIUME, Z. Final Report on the Safety Assessment of Lecithin and Hydrogenated Lecithin. **International Journal of Toxicology**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 21-45, 2001. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1080/109158101750300937>>.
- FLORIANO, J. F. *et al.* Biocompatibility studies of natural rubber latex from different tree clones and collection methods. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 461–470, fev. 2014.
- FLORIANO, J. F. *et al.* Exosomes Could Offer New Options to Combat the Long-Term Complications Inflicted by Gestational Diabetes Mellitus. **Cells NLM (Medline)**, [S. l.], 10 mar. 2020.
- FLORIANO, J. F. *et al.* Ketoprofen Loaded in Natural Rubber Latex Transdermal Patch for Tendinitis Treatment. **Journal of Polymers and the Environment**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 2281–2289, 2018.
- FLORIANO, J. F. *et al.* Natural Rubber Latex as Stem Cell Scaffold for Muscle Regeneration. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 33, n. S1, abr. 2019.

FLORIANO, J. F. *et al.* Pro-angiogenic approach for skeletal muscle regeneration. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], v. 1866, n. 2, fev. 2022.

GAHARWAR, A. K.; SCHEXNAILDER, P. J.; SCHMIDT, G. **Nanocomposite Polymer Biomaterials for Tissue Repair of Bone and Cartilage: A Material Science Perspective**. 1 ed. [S.l.: s.n.], 2012. 18 p.

GHASEMI-MOBARAKEH, L. *et al.* Key terminology in biomaterials and biocompatibility. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 10, p. 25-50, 2019.

GOYCOOLEA, F. M. *et al.* Chitosan-alginate blended nanoparticles as carriers for the transmucosal delivery of macromolecules. **Biomacromolecules**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 1736–1743, jul. 2009.

GUERRA, N. B. *et al.* Biomedical applications of natural rubber latex from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Materials Science and Engineering: C**, [S. l.], v. 126, p. 112126, jul. 2021.

GUIDELLI, É. J. *et al.* Silver nanoparticles delivery system based on natural rubber latex membranes. **Journal of Nanoparticle Research**, [S. l.], v. 15, n. 4, abr. 2013.

GUIMARÃES, D.; CAVACO-PAULO, A.; NOGUEIRA, E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 601, p. 120571, maio 2021.

GUNER, S.; OZTOP, M. H. Food grade liposome systems: Effect of solvent, homogenization types and storage conditions on oxidative and physical stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 513, p. 468–478, jan. 2017.

HAN, X. *et al.* Efficacy and safety of electrical stimulation for stress urinary incontinence in women: a systematic review and meta-analysis. **International Urogynecology Journal**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 789–799, 17 abr. 2022.

HEALEY, A. M.; HENDRA, P. J.; WEST, Y. D. A Fourier-transform Raman study of the strain-induced crystallization and cold crystallization of natural rubber. **Polymer**, [S. l.], v. 37, n. 18, p. 4009–4024, set. 1996.

HEEL, R. C. *et al.* Atenolol. **Drugs**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 425–460, jun. 1979.

HERCULANO, R. D. *et al.* Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR). **Materials Research**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 253–256, jun. 2009.

HIJAZ, A. K. *et al.* Stem cell homing factor, CCL7, expression in mouse models of stress urinary incontinence. **Female Pelvic Medicine and Reconstructive Surgery**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 356–361, 2013.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 66, n. 17, p. 2873–2896, 2009.

- HO, C. P.; BHATIA, N. N. Development of stem cell therapy for stress urinary incontinence. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 311-318, out. 2012.
- HSIEH, D. S. Drug permeation enhancement - theory and applications. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [S. l.], v. 20, n. 10, p. 1829, 1994.
- HUANG, C.-H. Phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. **Biochemistry**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 344–352, jan. 1969.
- HULE, R. A.; POCHAN, D. J. Polymer Nanocomposites for Biomedical Applications. **MRS Bulletin**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 354–358, abr. 2007.
- HUNTER, R. J. **Zeta potential in colloid science: principles and applications**. 1 ed., [S. l.]: Academic press, 1988. 398 p.
- JAIN, K. K. **An Overview of Drug Delivery Systems** [S.l: s.n.]. p. 1–54. 2020.
- JELLINGER, P. S. Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance. **Insulin**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 2–14, jan. 2009.
- JIANG, L. Q. *et al.* Altered response of skeletal muscle to IL-6 in type 2 diabetic patients. **Diabetes**, [S. l.], v. 62, n. 2, p. 355–361, fev. 2013.
- JORGE, A. C. *et al.* Impactos que a pandemia acarretou no processo de cirurgia eletiva: uma revisão bibliográfica. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. e38311729407, mai. 2022.
- KARAMALI, M. *et al.* Calcium plus Vitamin D supplementation affects pregnancy outcomes in gestational diabetes: Randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Public Health Nutrition**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 156–163, jan. 2016.
- KIRCH, W.; GÖRG, K. G. Clinical pharmacokinetics of atenolol — A review. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 81–91, abr. 1982.
- KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. **Journal of Membrane Science**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 211–227, jan. 1981.
- KUMAR ROY, S.; PRABHAKAR, B. Bioadhesive Polymeric Platforms for Transmucosal Drug Delivery Systems-a Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. [s.l: s.n.]. 2010. Disponível em: <<http://www.tjpr.org>>.
- LARGE, D. E. *et al.* Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 176, p. 113851, set. 2021.
- LENIS, A. T. *et al.* Impact of parturition on chemokine homing factor expression in the vaginal distention model of stress urinary incontinence. **Journal of Urology**, [S. l.], v. 189, n. 4, p. 1588–1594, abr. 2013.
- LI, X. *et al.* Administration of signalling molecules dictates stem cell homing for in situ regeneration. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. [S. l.], v. 21, n. 12, dez. 2017.

- LI, Z. LING *et al.* Pluronic modified liposomes for curcumin encapsulation: Sustained release, stability and bioaccessibility. **Food Research International**, [S. l.], v. 108, p. 246–253, jun. 2018.
- LIN, L. *et al.* Improving the stability of thyme essential oil solid liposome by using  $\beta$ -cyclodextrin as a cryoprotectant. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 188, p. 243–251, mai. 2018.
- LIU, D. *et al.* The smart drug delivery system and its clinical potential. **Theranostics**, [S. l.], v. 6, n. 9, p. 1306-1323, 2016.
- LIU, J. *et al.* Current Methods for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration. **BioMed Research International**. [S. l.], v. 2018, n. 1984879, 2018.
- LU, F. J.; HSU, S. L. A Vibrational Spectroscopic Analysis of the Structure of Natural Rubber. **Rubber Chemistry and Technology**, [S. l.], v. 60, n. 4, p. 647–658, 1 set. 1987.
- LU, Q. *et al.* Preparation and physicochemical characteristics of an allicin nanoliposome and its release behavior. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 57, n. 2, p. 686–695, jul. 2014.
- MAJA, L.; ŽELJKO, K.; MATEJA, P. Sustainable technologies for liposome preparation. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 165, p. 104984, nov. 2020.
- MANSUR, H. S. *et al.* FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Materials Science and Engineering: C**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 539–548, maio 2008.
- MARINI, G. *et al.* Importância do modelo animal para testar hipóteses sobre a fisiopatologia do binômio diabetes e incontinência urinária feminina. **Scientia Medica**, [S. l.: s.n.] v. 21, n. 4, p. 191-195, 2011.
- MARITIM, S.; BOULAS, P.; LIN, Y. Comprehensive analysis of liposome formulation parameters and their influence on encapsulation, stability and drug release in glibenclamide liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 592, p. 120051, jan. 2021.
- MASUI, K. *et al.* Detection of Glutamate Encapsulated in Liposomes by Optical Trapping Raman Spectroscopy. **ACS Omega**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 9701–9709, 22 mar. 2022.
- MAZUR-BIALY, A. I. *et al.* Urinary Incontinence in Women: Modern Methods of Physiotherapy as a Support for Surgical Treatment or Independent Therapy. **Journal of Clinical Medicine**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 1211, 23 abr. 2020.
- MCKIEVER, M.; FREY, H.; COSTANTINE, M. M. Challenges in conducting clinical research studies in pregnant women. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, [S. l.], v. 47, p. 287-293, ago. 2020.
- MIRANDA, M. C. R. *et al.* Silver nanoparticles effect on drug release of metronidazole in natural rubber latex dressing. **Polymer Bulletin**, [S. l.], v. 79, n. 11, p. 9957–9973, 2022.

- MLADENOVIC-SEGEDI, L. et al. Quality of life in women with pelvic floor dysfunction. **Vojnosanitetski pregled**, [S. l.], v. 68, n. 11, p. 940–947, 2011.
- MOHAMED, M. A. et al. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. In: **Membrane Characterization**. [S. l.]: Elsevier, 2017, cap. 1, p. 3–29.
- MORAWETZ, H. History of Rubber Research. **Rubber Chemistry and Technology**, [S. l.], v. 73, n. 3, p. 405–426, jul. 2000.
- MORISE, B. T. et al. Scopolamine loaded in natural rubber latex as a future transdermal patch for sialorrhoea treatment. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, [S. l.], v. 68, n. 13, p. 788–795, 2 set. 2019.
- MOZAFARI, M. R.; MORTAZAVI, S. M. **Nanoliposomes: From Fundamentals to Recent Developments**. 1 ed. [S. l.]: Trafford Publishing Ltd, 2005. 238 p.
- NAM, J. H.; KIM, S.-Y.; SEONG, H. Investigation on Physicochemical Characteristics of a Nanoliposome-Based System for Dual Drug Delivery. **Nanoscale Research Letters**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 101, 13 dez. 2018.
- NG, J. W.; OTHMAN, N.; YUSOF, N. H. Various coagulation techniques and their impacts towards the properties of natural rubber latex from *Hevea brasiliensis* — a comprehensive review related to tyre application. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 181, p. 114835, jul. 2022.
- NGAN, C. G. Y. et al. Engineering skeletal muscle – from two to three dimensions. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, [S. l.], v. 12, n. 1, jan. 2018.
- NOR, H. .; EBDON, J. . Ozonolysis of natural rubber in chloroform solution Part 1. A study by GPC and FTIR spectroscopy. **Polymer**, [S. l.], v. 41, n. 7, p. 2359–2365, mar. 2000.
- NUNES, S. K. et al. Impact of Gestational Diabetes Mellitus on Sexual Function: A Case–Control Study. **Journal of Women’s Health**, [S. l.], v. 29, n. 9, p. 1216–1225, 1 set. 2020.
- OLATUNJI, O. **Natural Polymers: Industry Techniques and Applicationse**. [S.l: s.n.]. 2016.
- PAPPALARDO, D.; MATHISEN, T.; FINNE-WISTRAND, A. Biocompatibility of Resorbable Polymers: A Historical Perspective and Framework for the Future. **Biomacromolecules**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 1465–1477, 2019.
- PARK, K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 190, p. 3–8, set. 2014.
- PATEL, H. et al. Matrix Type Drug Delivery System : A Review. **Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research (JPSBR)**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 143–151, 2011.
- PATEL, S. K. et al. Drug delivery strategies for management of women’s health issues in the upper genital tract. **Advanced Drug Delivery Reviews** [S. l.], v. 177, p. 113955, out. 2021.

- PÄTH, G. *et al.* Stem cells in the treatment of diabetes mellitus — Focus on mesenchymal stem cells. **Metabolism**, [S. l.], v. 90, p. 1–15, jan. 2019.
- PAUL, D. R.; ROBESON, L. M. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. **Polymer**. [S. l.], v. 49, n. 15, p. 3187-3204 7 jul. 2008.
- PELAZ, B. *et al.* Diverse Applications of Nanomedicine. **ACS Nano**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 2313–2381, 28 mar. 2017.
- PEREIRA, P. B. *et al.* Incontinência urinária feminina: uma revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, [S. l.], v. 11, n. 14, p. e1343, 4 set. 2019.
- PICULO, F. *et al.* Urethral striated muscle and extracellular matrix morphological characteristics among mildly diabetic pregnant rats: Translational approach. **International Urogynecology Journal**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 403–415, 2014.
- PORTO, I. C. C. M. Polymer Biocompatibility. In: **Polymerization**. 1 ed. [S. l.]: InTech, 2012. 438 p.
- PREDA, A.; MOREIRA, S. Incontinência Urinária de Esforço e Disfunção Sexual Feminina: O Papel da Reabilitação do Pavimento Pélvico. **Acta Médica Portuguesa**, [S. l.], v. 32, n. 11, p. 721–726, 4 nov. 2019.
- QIU, X. *et al.* Mesenchymal stem cells and extracellular matrix scaffold promote muscle regeneration by synergistically regulating macrophage polarization toward the M2 phenotype. **Stem Cell Research and Therapy**, [S. l.], v. 9, n. 1, abr. 2018.
- RAFAŁ KĘDZIA, J. *et al.* Natural Rubber Latex - Origin, Specification and Application. In: **Application and Characterization of Rubber Materials**. [S. l.]: IntechOpen. 2023. 126 p.
- RAHAMIM, V.; AZAGURY, A. Bioengineered Biomimetic and Bioinspired Noninvasive Drug Delivery Systems. **Advanced Functional Materials**, [S. l.], v. 31, n. 44, p. 2102033, 14 out. 2021.
- RAMCHURN, N. *et al.* Upper limb musculoskeletal abnormalities and poor metabolic control in diabetes. **European Journal of Internal Medicine**, [S. l.], v. 20, n. 7, p. 718–721, nov. 2009.
- RAMLI, N. A. *et al.* Physicochemical characteristics of liposome encapsulation of stingless bees' propolis. **Heliyon**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. e06649, abr. 2021.
- RAMOS-CABRER, P. *et al.* Stem cell mediation of functional recovery after stroke in the rat. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 5, n. 9, p. 1–11, 2010.
- RATNAPARKHI, M. P.; GUPTA JYOTI, P. Sustained Release Oral Drug Delivery System - An Overview. **International Journal of Pharma Research & Review**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 11–21, 2013.
- RATNER, B. D. *et al.* **Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine**. 3 ed. [S. l.]: Academic Press, 2012. 1573 p.
- RETNAKARAN, R. Hyperglycemia in pregnancy and its implications for a woman's future risk of cardiovascular disease. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [S. l.], v. 145, p. 193–199, nov. 2018.

RIVERA-DELGADO, E. *et al.* Local release from affinity-based polymers increases urethral concentration of the stem cell chemokine CCL7 in rats. **Biomedical Materials**, [S. l.], v. 11, n. 2, abr. 2016.

RIVERA-HERNÁNDEZ, G. *et al.* Polyvinyl alcohol based-drug delivery systems for cancer treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 600, n. 120478, mai. 2021.

ROBSON, A.-L. *et al.* Advantages and Limitations of Current Imaging Techniques for Characterizing Liposome Morphology. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 9, fev. 2018.

ROMMASI, F.; ESFANDIARI, N. Liposomal Nanomedicine: Applications for Drug Delivery in Cancer Therapy. **Nanoscale Research Letters**, [S. l.], Springer, 2021.

ROSSI, S. *et al.* Development of sponge-like dressings for mucosal/transmucosal drug delivery into vaginal cavity. **Pharmaceutical Development and Technology**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 219–226, mar. 2012.

RUDGE, M. V. C. *et al.* Study protocol to investigate biomolecular muscle profile as predictors of long-term urinary incontinence in women with gestational diabetes mellitus. **BMC Pregnancy and Childbirth**, [S. l.], v. 20, n. 1, 19 fev. 2020.

RUOZI, B. *et al.* AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 6, p. 557, mar. 2011.

SAUNDERS, R. A.; SMITH, D. C. Infra-Red Spectra and Structure of Hevea and Gutta Elastomers. **Journal of Applied Physics**, [S. l.], v. 20, n. 10, p. 953–965, out. 1949.

SHACKELFORD, J. F. **Ciência dos Materiais**. 6 ed. [S. l.]: Pearson Universidades. 2008.

SHAH, S. *et al.* Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 154–155, p. 102–122, 2020.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Modeling of diffusion controlled drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 161, n. 2, p. 351–362, jul. 2012.

SILVA, M. J. *et al.* Evaluation of the physicochemical properties of natural rubber from Hevea brasiliensis clones. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 171, p. 113925, nov. 2021.

SILVA, N. C. A. DA; MOROÇO, D. M.; CARNEIRO, P. S. O impacto da pandemia de COVID-19 no atendimento eletivo: experiência de um Hospital de nível terciário e Centro de Referência para a doença. **Revista Qualidade HC**, [S. l.], v. 2, n. 1, 2021.

SILVA, R. A. **Estudo da influência de aditivos orgânicos na blenda flexível condutora baseada em PEDOT:PSS e Látex Natural**. 2021. 82 f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, 2021.

- SILVA, R. A. *et al.* Effects of organic additives on film characteristics of flexible PEDOT:PSS/latex. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, [S. l.], v. 34, n. 19, p. 1488, 8 jul. 2023.
- SIMCHAREON, W. *et al.* Characterization of Natural Rubber Latex Film Containing Various Enhancers. **Procedia Chemistry**, [S. l.], v. 4, p. 308–312, 2012.
- SIVASANKARAPILLAI, V. S. *et al.* Progress in natural polymer engineered biomaterials for transdermal drug delivery systems. **Materials Today Chemistry**, [S. l.], v. 19, p. 100382, mar. 2021.
- SOPYAN, I.; INSAN SUNAN, K.; GOZALI, D. A Review: A Novel of Efforts to Enhance Liposome Stability as Drug Delivery Approach. **Systematic Reviews in Pharmacy**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 555–562, 2020.
- SRIRING, M. *et al.* Film formation process of natural rubber latex particles: roles of the particle size and distribution of non-rubber species on film microstructure. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 592, p. 124571, maio 2020.
- SUDHAMANI, S. .; PRASAD, M. .; UDAYA SANKAR, K. DSC and FTIR studies on Gellan and Polyvinyl alcohol (PVA) blend films. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 245–250, maio 2003.
- SUN, Z. Muscular response and adaptation to diabetes mellitus. **Frontiers in Bioscience**, [S. l.], v. Volume, n. 13, p. 4765, 2008.
- TAN, C.; WANG, J.; SUN, B. Biopolymer-liposome hybrid systems for controlled delivery of bioactive compounds: Recent advances. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 48, p. 107727, maio 2021.
- TIAN, M.-P. *et al.* Inducing sustained release and improving oral bioavailability of curcumin via chitosan derivatives-coated liposomes. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 120, p. 702–710, dez. 2018.
- TYAGI, P.; SANTOS, J. L. Macromolecule nanotherapeutics: approaches and challenges. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 1053–1061, mai. 2018.
- ULLAH, I.; SUBBARAO, R. B.; RHO, G. J. Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective. **Bioscience Reports** [S. l.], v. 35. n. 2, 2015.
- WANG, Y. Liposome as a delivery system for the treatment of biofilm-mediated infections. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 131, n. 6, p. 2626–2639, 12 dez. 2021.
- WANG, Y.; GRAINGER, D. W. Lyophilized liposome-based parenteral drug development: Reviewing complex product design strategies and current regulatory environments. **Advanced Drug Delivery Reviews**. [S. l.], Elsevier B.V., nov. 2019.
- WILKINSON, A. *et al.* Lipid conjugation of TLR7 agonist Resiquimod ensures co-delivery with the liposomal Cationic Adjuvant Formulation 01 (CAF01) but does not enhance immunopotentiality compared to non-conjugated Resiquimod+CAF01. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 291, p. 1–10, dez.

2018.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials**. 1 ed. Chester: Elsevier, 1987. 72 p.

WINEY, K. I.; VAIA, R. A. Polymer Nanocomposites. **MRS Bulletin**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 314–322, 31 abr. 2007.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 112–115, abr. 2008.

YAMAGUCHI, T. *et al.* Effects of frequency and power of ultrasound on the size reduction of liposome. **Chemistry and Physics of Lipids**, [S. l.], v. 160, n. 1, p. 58–62, jul. 2009.

YU, J.Y.; CHUESIANG, P.; SHIN, G.H.; PARK, H.J. Post-Processing Techniques for the Improvement of Liposome Stability. **Pharmaceutics**, [S. l.], v.13, n. 7, jul. 2021.

ZHANG, C. *et al.* Progress, challenges, and future of nanomedicine. **Nano Today**, [S. l.], v. 35, p. 101008, dez. 2020.

ZYLBERBERG, C.; MATOSEVIC, S. Bioengineered liposome–scaffold composites as therapeutic delivery systems. **Therapeutic Delivery**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 425–445, jun. 2017.

# **Contribuições científicas**

## Artigos Publicados

1. REYES, DAVID R. A. BARBOSA, ANGELICA M. P. JULIANA, FLORIANO F. SOFIA, QUIROZ B. C. V. COSTA, SARAH M. B. HALLUR, RAGHAVENDRA L. S. ENRIQUEZ, EUSEBIO M. A. OLIVEIRA, RAFAEL G. DE SOUZA ROSSIGNOLLI, PATRICIA PEDRONI, CRISTIANE RODRIGUES ALVES, FERNANDA C. B. **GARCIA, GABRIELA A.** ABBADE, JOELCIO F. CARVALHO, CAROLINA N. F. SOBREVIA, LUIS RUDGE, MARILZA V. C. CALDERON, IRACEMA I. M. P. SOUZA, F. P. LEHANA, T. GRAEFF, C. F. O. MAGALHÃES, C. G. COSTA, R. A. A. LIMA, S. A. M. RODRIGUES, M. R. K. FELISBINO, S. L. , *et al.* ; Viability of ex-vivo myography as a diagnostic tool for rectus abdominis muscle electrical activity collected at Cesarean section within a diamater cohort study. Biomedical Engineering Online, v. 21, p. 1, 2022.
2. ALVES, F. C. B. ; OLIVEIRA, R. G. ; REYES, D. R. A. ; **GARCIA, G. A.** ; FLORIANO, J. F. ; SHETTY, R. H. L. ; MARECO, E. A. ; DAL-PAI-SILVA, M. ; PAYAO, S. L. M. ; SOUZA, F. P. ; WITKIN, S. S. ; SOBREVIA, L. ; BARBOSA, A. M. P. ; RUDGE, M. V. C. ; The DIAMATER Study Group . Transcriptomic profiling of rectus abdominis muscle in women with gestational diabetes-induced myopathy: Identification of potential biomarkers of pregnancy-specific urinary incontinence. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, v. 1, p. 1, 2022.
3. FLORIANO, JULIANA FERREIRA ; BARBOSA, ANGÉLICA MÉRCIA PASCON ; DE OLIVEIRA, RAFAEL GUILLEN ; VEGA, SOFÍA ; CATINELLI, BRUNA BOLOGNA ; **GARCIA, GABRIELA AZEVEDO** ; REYES, DAVID RAFAEL ; SOBREVIA, LUIS ; RUDGE, MARILZA VIEIRA CUNHA . Maternal care of the whole litter improves the success rate of diabetes in pregnancy in rats. PLACENTA, v. 1, p. 1, 2022.
4. **GARCIA, G. A.** ; OLIVEIRA, R. G. ; DARIOLLI, R. ; RUDGE, M. V. C. ; BARBOSA, A. M. P. ; FLORIANO, J. F. ; RIBEIRO-PAES, J. T. . Isolation and characterization of farm pig adipose tissue-derived mesenchymal stromal/stem cells. Brazilian Journal of Medical and Biological Research (on line), v. 55, p. e12343, 2022.
5. RUDGE, MARILZA V.C. ; ALVES, FERNANDA C.B. ; HALLUR, RAGHAVENDRA L.S. ; OLIVEIRA, RAFAEL G. ; VEGA, SOFIA ; REYES, DAVID R.A. ; FLORIANO, JULIANA F. ;

PRUDENCIO, CAROLINE B. ; **GARCIA, GABRIELA A.** ; REIS, FABIANA V.D.S. ; EMANUELI, COSTANZA ; FUENTES, GONZALO ; CORNEJO, MARCELO ; TOLEDO, FERNANDO ; VALENZUELA-HINRICHSEN, ANDRÉS ; GUERRA, CATALINA ; GRISMALDO, ADRIANA ; VALERO, PAOLA ; BARBOSA, ANGELICA M.P. ; SOBREVIA, LUIS . Consequences of the exposome to gestational diabetes mellitus. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-GENERAL SUBJECTS*, v. 1867, p. 130282, 2022.

## Artigos Publicados como *Diamater Study Group*

Grupo de pesquisa

**Grupo Acadêmico Diabete e Gravidez - Clínico e Experimental**

Para consultas: [dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/4533799418368253](http://dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/4533799418368253)

1. FRANCA, D. C. H. ; FRANCA, E. L. ; SOBREVIA, L. ; BARBOSA, A. M. P. ; HONORIO-FRANCA, A. C. ; RUDGE, M. V. C. ; **Diamater Study Group** . Integration of nutrigenomics, melatonin, serotonin and inflammatory cytokines in the pathophysiology of pregnancy-specific urinary incontinence in women with gestational diabetes mellitus. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR BASIS OF DISEASE*, v. 1, p. 1, 2023.
2. CATINELLI, BRUNA B. ROSSIGNOLI, PATRÍCIA S. FLORIANO, JULIANA F. CARR, ALINE M. DE OLIVEIRA, RAFAEL G. DOS SANTOS, NILTON J. ÚBEDA, LARA C. C. SPADELLA, MARIA ANGÉLICA HALLUR, RAGHAVENDRA L. S. SOBREVIA, LUIS FELISBINO, SÉRGIO L. CALDERON, IRACEMA M. P. BARBOSA, ANGÉLICA M. P. RUDGE, MARILZA V. C. RUDGE, M. V. C. BARBOSA, A. M. P. CALDERON, I. M. P. SOBREVIA, L. SOUZA, F. P. BERGHMANS, B. THABANE, L. JUNGINGER, B. GRAEFF, C. F. O. MAGALHÃES, C. G. COSTA, R. A., **Diamater Study Group** , *et al.* ; Reversal of diabetic-induced myopathy by swimming exercise in pregnant rats: a translational intervention study. *Scientific Reports*, v. 12, p. 1, 2022.

3. PRUDENCIO, CAROLINE BALDINI NUNES, STHEFANIE KENICKEL PINHEIRO, FABIANE AFFONSO FILHO, CARLOS ISAIAS SARTORÃO ANTÔNIO, FLÁVIA IGNÁCIO DE AQUINO NAVA, GUILHERME THOMAZ RUDGE, MARILZA VIEIRA CUNHA BARBOSA, ANGÉLICA MÉRCIA PASCON CALDERON, I. M. P. SOUZA, F. P. BERGHMANS, B. DE BIE, R. THABANE, L. JUNGINGER, B. GRAEFF, C. F. O. MAGALHÃES, C. G. COSTA, R. A. LIMA, S. A. M. KRON-RODRIGUES, M. R. FELISBINO, S. BARBOSA, W. CAMPOS, F. J. BOSSOLAN, G. CORRENTE, J. E. NUNES, H. R. C. , **Diamater Study Group *et al.*** ; Relaxin-2 during pregnancy according to glycemia, continence status, and pelvic floor muscle function. INTERNATIONAL UROGYNECOLOGY JOURNAL, v. 1, p. 1, 2022.
4. PINHEIRO, F. A. ; SARTORAO FILHO, C. I. ; PRUDENCIO, C. B. ; NUNES, S. K. ; PASCON, T. ; HALLUR, L. S. R. ; TAKANO, L. ; ENRIQUEZ, E. M. A. ; CATINELLI, B. B. ; CARR, A. M. ; JUNGINGER, B. ; RUDGE, M. V. C. ; BARBOSA, A. M. P. ; **The Diamater Study Group** . Pelvic floor muscle dysfunction at 3D transperineal ultrasound in maternal exposure to gestational diabetes mellitus: A prospective cohort study during pregnancy. Neurourology and Urodynamics, v. 1, p. 1, 2022.
5. PRUDENCIO, C. B. ; NUNES, S. K. ; PINHEIRO, F. A. ; SARTORAO-FILHO, C. I. ; DE-AQUINO-NAVA, G. T. ; SALOMONI, S. E. ; PEDRONI, C. R. ; RUDGE, M. V. C. ; BARBOSA, A. M. P. ; **Diamater Study Group** . Gestational diabetes is associated with alteration on pelvic floor muscle activation pattern during pregnancy and postpartum: Prospective cohort using electromyography assessment. Frontiers in Endocrinology, v. 1, p. 1, 2022.
6. RUDGE, MARILZA V. C. SOUZA, FÁTIMA P. ABBADE, JOELCIO F. HALLUR, RAGHAVENDRA L. S. MARCONDES, JOÃO PAULO C. PICULO, FERNANDA MARINI, GABRIELA VESENTINI, GIOVANA THABANE, LEHANA WITKIN, STEVEN S. CALDERON, IRACEMA M. P. BARBOSA, ANGÉLICA M. P. RUDGE, M. V. BARBOSA, A. M. P. CALDERON, I. M. P. SOUZA, F. P. ABBADE, J. F. HALLUR, L. S. R. MARINI, G. THABANE, L. PALMA, M. S. GRAEFF, C. F. O. ARNI, R. K. HERCULANO, R. D. SALVADORI, D. F. , **Diamater Study Group *et al.*** ; Study protocol to investigate biomolecular muscle profile as predictors of long-term urinary incontinence in women with gestational diabetes mellitus. BMC Pregnancy and Childbirth, v. 20, p. 117-117, 2020.

7. VESENTIN, G. ; BARBOSA, A. M. P. ; DAMASCENO, D. C. ; MARINI, G. ; PICULO, F. ; MATHEUS, S. M. M. ; HALLUR, R. L. S. ; NUNES, S. K. ; CATINELLI, B. B. ; MAGALHAES, C. G. ; COSTA, R. ; ABBADE, J. F. ; CORRENTE, J. E. ; CALDERON, I. M. P. ; RUDGE, M. V. C. ; GROUP, T. D. S. ; **The DIAMATER Study Group** . Alterations in the structural characteristics of rectus abdominis muscles caused by diabetes and pregnancy: A comparative study of the rat model and women. PLoS One, v. 15, p. 1, 2020.
8. VESENTINI, G. ; BARBOSA, A. M. P. ; FLORIANO, J. F. ; FELISBINO, S. L. ; COSTA, S. M. ; PICULO, F. ; MARINI, G. ; NUNES, S. K. ; REYES, D. R. A. ; MARCONDES, J. P. ; HALLUR, R. L. S. ; ROZZA, A. L. ; MAGALHAES, C. G. ; COSTA, R. ; ABBADE, J. F. ; CORRENTE, J. E. ; CALDERON, I. M. P. ; MATHEUS, S. M. M. ; RUDGE, M. V. C. ; **The Diamater Study Group** . Deleterious effects of gestational diabetes mellitus on the characteristics of the rectus abdominis muscle associated with pregnancy-specific urinary incontinence. DIABETES RESEARCH AND CLINICAL PRACTICE, v. 166, p. 1, 2020.

## Resumos publicados em anais de congressos

1. ALVES, F. C. B. ; CARVALHO, C. N. F. ; OLIVEIRA, R. G. ; REYES, D. R. A. ; **GARCIA, G. A.** ; BARBOSA, A. M. P. ; RUDGE, M. V. C. . Proteomic profiling of Gestational Diabetic-induced Myopathy in rectus abdominis muscle of gestational diabetes mellitus women with pregnancy-specific urinary incontinence. In: III IBEROAMERICAN Conference on Mass Spectrometry, 2022, Rio de Janeiro. III IberoAmerican Conference on Mass Spectrometry Abstracts ? Poster presentations, 2022. p. 211-212.
2. ALVES, F. C. B. ; OLIVEIRA, R. G. ; REYES, D. R. A. ; **GARCIA, G. A.** ; CARVALHO, C. N. F. ; BARBOSA, A. M. P. ; RUDGE, M. V. C. . Metabolic alterations caused by Gestational Diabetes Mellitus in the Rectus Abdominal Muscle in Gestational Diabetic-induced Myopathy. In: III IBEROAMERICAN Conference on Mass Spectrometry, 2022, Rio de Janeiro. III IberoAmerican Conference on Mass Spectrometry Abstracts ? Poster presentations, 2022. p. 535-536.
3. ALVES, F. C. B. ; OLIVEIRA, R. G. ; REYES, D. R. A. ; **GARCIA, G. A.** ; COSTA, S. M. B. ; FLORIANO, J. F. ; MARECO, E. A. ; BARBOSA, A. M. P. ; RUDGE, M. V. C. . Transcriptome

- profiling of rectus abdominis muscle of pregnant women to identify potential biomarkers of the triad: gestational diabetes mellitus, pregnancy-specific urinary incontinence, and gestational hyperglycemic myopathy as predictors of long-term urinary incontinence. In: XXIII FIGO World Congress of Gynecology and Obstetrics, 2021. Poster Abstracts, 2021. p. 188.
4. CATINELLI, B. B. ; ROSSIGNOLLI, P. S. ; FLORIANO, J. F. ; CARR, A. M. ; OLIVEIRA, R. G. ; SANTOS, N. J. ; UBEDA, L. C. C. ; SPADELLA, M. A. ; FELISBINO, S. L. ; SARTORAO FILHO, C. I. ; CALDERON, I. M. P. ; BARBOSA, A. M. P. ; RUDGE, M. V. C. ; **The DIAMATER Study Group** . Reversal of diabetic-induced myopathy by swimming exercise in pregnant rats: an intervention study. In: XXIII FIGO World Congress of Gynecology and Obstetrics, 2021. Poster Abstracts, 2021. p. 404-404.
  5. R G, OLIVEIRA; F C B, ALVES ; D R A, REYES ; **G A, GARCIA** ; S M B, COSTA ; N J D, SANTOS ; A M P, BARBOSA ; M V C, RUDGE . Importância da Padronização do Preparo e Armazenamento de Músculo Reto Abdominal para Análises Morfológicas: Considerações Metodológicas. In: Encontro de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, 2020, Botucatu. Anais do XI Encontro de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, 2020. p. 97.

## Apresentações de Trabalho

1. BARBOSA, V. P. ; PRUDENCIO, C. B. ; NUNES, S. K. ; FIGUEIREDO, V. V. ; PINHEIRO, F. A. ; FAVARO, L. ; NAVA, G. T. A. ; OLIVEIRA, R. G. ; **GARCIA, G. A.** ; BARBOSA, A. M. P. ; RUDGE, M. V. C. . Prevalence, severity and impact of pregnancy-specific urinary incontinence in primigravid and second-pregnant women. 2022. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. ALVES, F. C. B. ; OLIVEIRA, R. G. ; CARVALHO, C. N. F. ; REYES, D. R. A. ; **GARCIA, G. A.** ; BARBOSA, A. M. P. ; RUDGE, M. V. C. . Proteomic profiling of Gestational Diabetic-induced Myopathy in rectus abdominis muscle of gestational diabetes mellitus women with pregnancy-specific urinary incontinence. 2022. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
3. ALVES, F. C. B. ; OLIVEIRA, R. G. ; REYES, D. R. A. ; **GARCIA, G. A.** ; CARVALHO, C. N. F. ; BARBOSA, A. M. P. ; RUDGE, M. V. C. . Metabolic alterations caused by Gestational Diabetes

- Mellitus in the Rectus Abdominal Muscle in Gestational Diabetic-induced Myopathy. 2022. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
4. OLIVEIRA, R. G.; QUIROZ, S. B. C. V. ; **GARCIA, G. A.** ; SANTOS, N. J. ; FLORIANO, J. F. ; SAKALEM, M. E. ; RIBEIRO-PAES, J. T. ; BARBOSA, A. M. P. ; RUDGE, M. V. C. . Human Skeletal Muscle Organoid Development: An Overview of Three-Dimensional Culture Construction. 2021. (Apresentação de Trabalho/Outra).
  5. **GARCIA, G. A.**; FLORIANO, J. F., RUDGE, M. V. C.; OLIVEIRA, A. G.; GRAEFF, C. F. O.. Desenvolvimento de Dispositivo Vaginal de Entrega Sustentada de Drogas Baseado em Látex Natural e Nanoencapsulação de CCL7. In: Anais da 1ª Reunião Técnica Virtual do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT). Anais...Bauru(SP) online, 2020. (Apresentação de Trabalho/Reunião Técnica Virtual).
  6. OLIVEIRA, R. G.; ALVES, F. C. B. ; REYES, D. R. A. ; **GARCIA, G. A.** ; COSTA, S. M. B. ; SANTOS, N. J. ; BARBOSA, A. M. P. ; RUDGE, M. V. C. . Importância da Padronização do Preparo e Armazenamento de Músculo Reto Abdominal para Análises Morfológicas: Considerações Metodológicas. 2020. (Apresentação de Trabalho/Outra).
  7. REYES, D. R. A. ; FLORIANO, J. F. ; QUIROZ, S. B. C. V. ; COSTA, S. M. B. ; HALLUR, L. S. R. ; ENRIQUEZ, E. M. A. ; OLIVEIRA, R. G. ; ROSSIGNOLLI, P. S. ; PEDRONI, C. R. ; ALVES, F. C. B. ; SOBREVIA, L. ; BARBOSA, A. M. P. ; RUDGE, M. V. C. ; CALDERON, IRACEMA M. P. ; **The DIAMATER Study Group** . Evaluation of the pregnant women rectus abdominis muscle function - An ex vivo contractility analysis using myography. 2020. (Apresentação de Trabalho/Outra).