

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC**  
**Projeto de Pesquisa**  
**Iniciação Científica - Edital Nº 04/2021**

**Obtenção e avaliação biológica de biomaterial eletrofiado  
de bagaço de uva**

**São Bernardo do Campo**

## RESUMO

Os arcabouços ou *scaffolds* são ferramentas de extrema importância para a Engenharia de Tecidos e as tecnologias de medicina regenerativa. Podendo ser biomateriais de origem natural (biológica) ou sintética, os *scaffolds* contribuem com o suporte para as células, além de estimular respostas de migração, proliferação e diferenciação celular, visando a formação de um novo tecido a ser implantado no paciente. A escolha de biomateriais biológicos muito se justifica pelas vantagens de boa biocompatibilidade, baixa toxicidade e, muitas vezes, biomimetismo. Deste modo, a partir de levantamento bibliográfico na área de Engenharia de Tecidos e materiais implantáveis, este projeto tem como objetivo a elaboração de um biomaterial a base do bagaço de uva (*Vitis vinifera*) por meio de eletrofiação. O interesse sobre esse bio-resíduo está relacionado com as concentrações relativamente altas de compostos fenólicos em seus componentes, apresentando atividades antioxidante, anti-inflamatória e vasodilatadora. Este projeto estima uma revisão bibliográfica sobre a utilização de bagaço de uva na Engenharia de Tecidos, na elaboração de um biomaterial, sua caracterização morfológica, com testes de degradação *in vitro* e ângulo de contato, além de avaliações de citotoxicidade direta e proliferação celular relacionados ao biomaterial, visando futuramente a sua aplicação em regeneração tecidual de pele.

**Palavras-chave:** Curativos; Polifenóis; Técnicas de cultura de células; Uvas; Biomaterial.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS.....	3
	2.1.Objetivo Geral.....	3
	2.2.Objetivos Específicos .....	3
3.	MÉTODOS .....	4
	3.1 Revisão de Bibliografia .....	4
	3.2 Obtenção do Biomaterial .....	4
	3.2.a Morfologia do Biomaterial .....	5
	3.3.b Degradação <i>in vitro</i> .....	5
	3.3.c Ângulo de Contato .....	5
	3.4 Cultura de Células .....	6
	3.5 Avaliação da Citotoxicidade Direta .....	6
	3.6 Avaliação da Proliferação Celular.....	7
4.	CRONOGRAMA .....	7
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	8

## 1. INTRODUÇÃO

A Engenharia de Tecidos tem como objetivo a regeneração de órgãos e tecidos vivos, e/ou o reparo da função destes, baseado em células, moléculas bioativas e suporte matricial (LANGER et al., 1993; LU et al., 2011; SAHAKYANTS et al., 2020). A função de suporte matricial pode ser desempenhada por arcabouços biológicos naturais, obtidos a partir de matérias primas encontradas nos seres vivos, muito comumente elementos da matriz extracelular de tecidos animais, ou sintéticos, como biomateriais metálicos, cerâmicos, compósitos e poliméricos (WILLIAMS, 1999; CHONG et al., 2022).

Os suportes matriciais, também conhecidos como *scaffolds* ou arcabouços, tem a função primordial de condução do processo de regeneração tecidual, ou atuam diretamente no desempenho da função desse tecido (LANGER et al., 1993; SAHAKYANTS et al., 2020). Para tanto, os suportes permitem o alojamento de células e estimulam comportamentos como a migração celular, por quimiotaxia, proliferação ou mesmo diferenciação (LANGER, 2000; BARBANTI et al., 2005). Algumas características dos suportes favorecem os comportamentos celulares mencionados, como a hidrofiliabilidade, superfície de contato, porosidade, degradabilidade e biocompatibilidade, entre outras (BARBANTI et al., 2005; CHONG et al., 2022).

As características dos polímeros naturais direcionam sua aplicação para engenharia de tecidos em diferentes áreas, como na regeneração de pele, na forma de curativos bioativos, por exemplo (PIRES et al., 2015; CELIKKIN et al., 2017; KOHANE et al., 2022). Polímeros obtidos a partir de tecidos vegetais apresentam algumas vantagens relacionadas as propriedades de resistência mecânica, facilidade de obtenção em grandes quantidades, e propriedades bioativas.

A uva (*Vitis vinifera*) é uma fonte promissora para a obtenção de suportes bioativos (BUSTAMANTE et al., 2008; PANZELLA et al., 2017). Apresenta polifenóis em seus componentes com características bioativas, como atividade antioxidante, vasodilatadora e antimicrobiana

(LEIFERT et al, 2008; MUDNIC et al., 2012; GRUZ et al., 2013; PETERSEN et al., 2016; JUNIOR et al., 2019; CARULLO et al. 2020).

Diante destes avanços nos ramos da medicina regenerativa e da ciência dos biomateriais, este projeto tem interesse na avaliação de um produto natural específico, o bagaço de uva. Composto em sua maioria de casca e sementes de uva, o bagaço é um dos bio-resíduos mais investigados, sendo considerado um subproduto da vinicultura, correspondendo a aproximadamente 20% do volume total processado (BUSTAMANTE et al., 2008; PANZELLA et al., 2017).

O bagaço da uva é um importante resíduo da indústria de vinicultura, não apresentando alto valor agregado, e que apresenta potencial bioativo por apresentar compostos fenólicos e fibras. A obtenção de biomateriais a partir desses resíduos pode ser proposta de diferentes formas, para diferentes polímeros, inclusive por eletrofiação. A técnica de eletrofiação é utilizada para a obtenção de fibras de tamanhos e orientação controlados a partir de diferentes matérias primas, como polímeros (LI et al., 2013; LEE et al., 2009). Dependendo das condições de processamento, podem ser obtidas mantas com características compatíveis e aplicação clínica, acrescidos da bioatividade potencial do bagaço da uva (LOCILENTO et al., 2019).

Desta forma, este projeto de pesquisa visa levantar dados de literatura relativos ao desenvolvimento e a caracterização de biomaterial eletrofiado a partir do bagaço de uva para futura aplicação em engenharia de tecidos da pele, na forma de curativos para o tratamento de feridas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo geral deste projeto é realizar avaliação biológica *in vitro* de biomaterial obtido do bagaço de uva, visando futuramente a sua aplicação em regeneração tecidual de pele.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Revisão de bibliografia;
- Obtenção e caracterização de biomaterial obtido de bagaço de uva;
- Avaliação de citotoxicidade do biomaterial;
- Avaliação da proliferação celular na presença do biomaterial.

### **3. MÉTODOS**

#### **3.1 Revisão de Bibliografia**

A revisão de bibliografia será desenvolvida abordando o tema desse projeto, o potencial de aplicação clínica de bagaço de uva.

Para tanto serão consultadas as bases de dados: Scielo, PubMed, ScienceDirect e Google Acadêmico. Serão propostas palavras-chave que permitam o levantamento de publicações relevantes para o tema, sendo propostas inicialmente (em português e com as devidas traduções): polifenóis, extrato de uva, avaliação biológica, aplicação clínica, fitoterápico, biomaterial, Engenharia de Tecidos. Os artigos científicos serão selecionados e avaliados criticamente.

#### **3.2 Obtenção do Biomaterial**

Para o preparo dos biomateriais serão obtidos separados a casca e os caules, ou engaço. Serão adaptados protocolos descritos anteriormente (ROCKENBACH et al., 2007; JIN et al., 2013), descrito resumidamente a seguir.

O bagaço da uva será seco em estufa. As sementes de uva serão separadas, lavadas e secas novamente. Para a extração as sementes serão trituradas e será utilizado hexano durante 6 horas, como agente desengordurante. Os extratos serão preparados a partir de 1,5 g de material seco e 25 mL de metanol como solvente, em agitação, durante 24 horas. O extrato será filtrado e o volume final ajustados para 25mL (ROCKENBACH et al., 2007). Será realizada a rotoevaporação do extrato para a obtenção de pó.

PLA e extrato de semente de uva, em pó, na proporção de 60:40, serão dissolvidos em uma mistura de clorofórmio e álcool etílico (1:1), sob agitação magnética, para o processo de eletrofiação (JIN et al., 2013). Serão utilizados 2mL da solução citada, seringa de vidro de 1 mm de diâmetro interno, posicionada a 10 cm do coletor no equipamento de eletrofiação, realizada a vazão de 1 mL/h a uma tensão (DC) de 15 kV.

As membranas eletrofiadas obtidas serão caracterizadas, conforme descrito a seguir. Para os ensaios de degradação e cultura celulares membranas serão esterilizadas por exposição a radiação ultravioleta (UV).

### **3.2.a Morfologia do Biomaterial**

A caracterização morfológica do biomaterial será realizada por microscopia eletrônica de varredura. O biomaterial será fixado com glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato (pH 7,4), durante 1 hora, lavado em tampão fosfato, PBS, durante 1 hora, seguida de lavagem em água (30 minutos), secagem em ponto crítico (EM CPD300, Leica), e recobrimento com 15 nm de ouro em metalizador (sputtering) (Leica, EM ACE600). A observação será realizada ao Microscópio de Eletrônico de Varredura (Quanta 250, FEI). Os resultados obtidos serão analisados com o programa de análise de imagens Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

### **3.3.b Degradação *in vitro***

Será realizada a avaliação da degradação *in vitro* do biomaterial. Para tanto, amostras do biomaterial serão incubadas com de solução tampão fosfato (PBS), 0,1M e pH 7,4, para simular condições fisiológicas. A degradação será avaliada por perda de massa e análise morfológica, nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Os biomateriais serão pesados ao início do ensaio e nos tempos determinados, depois de secos em estufa a vácuo, e a perda de massa será expressa em porcentagem relativa ao peso inicial de cada amostra. Para avaliação morfológica os biomateriais em cada tempo determinado neste ensaio serão processados para microscopia eletrônica de varredura, conforme descrito no item 3.2.a.

### **3.3.c Ângulo de Contato**

Será avaliado o ângulo de contato do biomaterial, pela medição da gota estática, utilizando o método sésil, com a detecção do perfil da gota em contato com a superfície do substrato, utilizando água destilada como fluido de deposição, com tensiômetro (Attension KSV).



### **3.4 Cultura de Células**

Para avaliação biológica do extrato será utilizada a linhagem de células VERO (Adolfo Lutz, São Paulo). A cultura destas células será realizada em meio HAM F10, contendo 10% de soro fetal bovino, e 100µg/ml de penicilina/estreptomicina, a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Serão realizadas trocas de meio de cultura a cada três dias, e repiques quando houver confluência da monocamada celular. O acompanhamento das culturas será realizado por microscopia de fase, ao microscópio invertido (Axiovert A1 / Zeiss).

### **3.5 Avaliação da Citotoxicidade Direta**

Será realizada avaliação da citotoxicidade pelo método direto (ISO 10993-5, 2009). Será utilizada placa de 96 poços, com a inoculação de suspensão celular a densidade de 10<sup>4</sup> células/poço. As culturas celulares serão incubadas até atingir a condição de subconfluência da monocamada, em 24 horas. Em seguida as culturas celulares serão expostas ao extrato obtido, permanecendo nessa condição por 24 horas. Serão utilizadas as concentrações do extrato de 25, 50, 75 e 100 µg/mL.

Como controle negativo, não citotóxico, serão mantidas as condições ideais de cultura diretamente nas placas. Como controle positivo, reconhecidamente citotóxico, será utilizada amostra de látex. Os ensaios serão realizados em triplicata.

O resultado qualitativo da citotoxicidade será obtido com observação por microscopia de fase, ao microscópio invertido (Axiovert A1 / Zeiss).

A avaliação quantitativa será obtida pelo método de MTT (brometo de 3-[4, 5-dimethyl thiazolone-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium). Para tanto, após a avaliação morfológica das células o meio de cultura será removido, seguido da lavagem com tampão fosfato (PBS, pH7,4, 0,1M), sendo então inoculada solução de MTT aos poços de cultura (5 mg/ml). Após 2-4 horas de incubação, a solução será removida, seguindo de nova lavagem dos poços com PBS, e adição de 50 µL de DMSO (Synth) filtrado, e leitura espectofotométrica a 570 nm, em leitor de Elisa.

Serão apresentados dados de porcentagem da viabilidade celular relativa ao controle negativo. Será realizada análise estatística dos dados, com teste ANOVA one-way seguido de teste de Tuckey para  $p < 5\%$ .

### 3.6 Avaliação da Proliferação Celular

Para avaliação da proliferação celular será utilizada análise qualitativa, de acordo com o método descrito no item 3.3 desse projeto, sendo considerados períodos de 48 e 72. Após a observação ao contraste de fase as células serão fixadas (glutaraldeído 2,5%) e coradas com cresil violeta, para análise citoquímica ao microscópio de luz.

## 4. CRONOGRAMA

As atividades propostas para o desenvolvimento do projeto serão realizadas no período de setembro de 2022 a agosto de 2023. Estão previstos os relatórios parcial e final, bem como a divulgação dos resultados obtidos em congresso e em revista científica da área. Segue a descrição do cronograma de atividades do projeto.

Descrição das atividades	1º Bimestre	2º Bimestre	3º Bimestre	4º Bimestre	5º Bimestre	6º Bimestre
Revisão de literatura	X	X	X	X	X	
Obtenção do Biomaterial			X	X		
Caraterização do Biomaterial		X	X	X	X	
Relatório Parcial			X			
Citotoxicidade			X	X	X	
Proliferação celular				X	X	X
Relatório Final						X

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBANTI, S. H., ZAVAGLIA, C. A. C. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BUSTAMANTE, M. A., MORAL, R., PAREDES, C., PÉREZ-ESPINOSA, A., MORENO-CASELLES, J., PÉREZ-MURCIA, M. D. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management*, v. 28, p: 372-380, 2008.

CARULLO, G., SCIUBBA, F., GOVERNA, P., MAZZOTTA, S., FRATTARUOLO, L., GRILLO, G., CAPPELLO, A. R., CRAVOTTO, G., COCCO, M. E. D., AIELLO, F. Mantonico and Pecorello Grape Seed Extracts: Chemical Characterization and Evaluation of In Vitro Wound-Healing and Anti-Inflammatory Activities. *Pharmaceuticals* 2020, 13, 97; DOI:10.3390/ph13050097. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32423026/>. Acesso em: 18 out. 2021.

CELIKIN, N., RINOLDI, C., COSTANTINI, M., TROMBETTA, M., RAINER, A., ŚWIĘSZKOWSKI, W. Naturally derived proteins and glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering applications. *Mater. Sci. and Eng. C.*, v. 78, p: 1277–1299, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.016>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28575966/>. Acesso em: 22 mai. 2021.

CHONG, E. T. J., NG, J.W., LEE, P. C. Classification and medical applications of biomaterials—A mini review. *BIO Integration*, bioi20220009, 2022.

GRUZ, A. P. G., SOUSA, C. G. S., TORRES, A. G., FREITAS, S. P., CABRAL, Bras. Frutic., v. 35, n. 4, p. 1147-1157, 2013.

JIN G., PRABHAKARAN M.P., KAI D., ANNAMALAI S.K., ARUNACHALAM K.D., RAMAKRISHNA S. Tissue engineered plant extracts as nanofibrous wound dressing. *Biomaterials*, v.34, n.3, p:724-734, 2013.

JUNIOR, J. B., LEITE, K. C. S., GIL, E. S., ROCHA, M. L. Antioxidant and Vasodilatory Action of Grape Juices Produced in Different Regions of Brazil. *Inter. Journal. of Card. Sci*, v. 32, n. 3, p: 238-246, 2019.

LANGER, R., VACANTI, J. P. Tissue engineering. *Science*, v. 260, n. 6, p: 920, 1993. DOI: 10.1126/science.8493529. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8493529/>. Acesso em: 06 mai. 2021.

LANGER, R. Tissue Engineering. *Molecular Therapy*, v. 1, n. 1, 2000. DOI: 10.1006/mthe. - 1999.0003, Disponível em: <http://www.idealibrary.com>. Acesso em: 06 mai. 2021.

KOHANE, D. S., LANGER, R. Polymeric biomaterials in tissue engineering. *Pediatric Research*, v.63, p: 487-491, 2022.

LI Z., WANG C.: One-dimensional nanostructures. *Electrospinning Technique and unique nanofibers*. SpringerBriefs in Materials. Springer, Heidelberg, 2013.

LEE K. Y., JEONG L., KANG Y. O., LEE S. J., PARK W. H.: Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 61, p. 1020- 1024, 2009.

LEIFERT, W. R., ABEYWARDENA, M. Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research*, v. 28, n. 11, p: 729-737, 2008.

LOCILENTO, D. A., MERCANTE, L. A., ANDRE, R.A., MATTOSO, L. H.C.C., LUNA, G. L. F., BRASSOLATTI, P., ANIBAL, F. F., CORREA, D. S. Biocompatible and biodegradable electrospun nanofibrous membranes loaded with grape seed extract for wound dressing application. *Journal of Nanomaterials*, v. 2019, Article ID 2472964, pp.11, 2019.

LU, H., HOSHIBA, T., KAWAZOE, N., CHEN, G. Autologous extracellular matrix scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 32, p: 2489-2499, 2011. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21211834/>. Acesso em: 22 mai. 2021.

MUDNIC, I., BUDIMIR, D., MODUN, D., GUNJACA, G., GENERALIC, I., SKROZA, D., KATALINIC, V., LJUBENKOV, I., BOBAN, M. Antioxidant and vasodilatory effects of blackberry and grape wines. *J Med Food*, v. 15, n. 3, p: 315-321, 2012. DOI: 10.1089/jmf.2011.0129. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22082099/>. Acesso em: 13 mai. 2021.

PANZELLA, L., NAPOLITANO, A. Natural Phenol Polymers: Recent Advances in Food and Health Applications. *Antioxidants*, v. 6, 2017. DOI: 10.3390/antiox6020030. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28420078/>. Acesso em: 13 mai. 2021.

PIRES, A. L. R., BIERHALZ, A. C. K., MORAES, A. M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. *Quim. Nova*, v. 38, n. 7, p: 957-971, 2015.

PETERSEN, K. S., SMITH, C. Ageing-Associated Oxidative Stress and Inflammation Are Alleviated by Products from Grapes. *Oxid. Med. Cell Longev.*, v. 2016, 2016. DOI: 10.1155/2016/6236309. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27034739/>. Acesso em: 13 mai. 2021.

ROCKENBACH I.I., SILVA G.L., RODRIGUES E., GONZAGA L.V., FETT R. Atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva das variedades Regente e Pinot Noir (*Vitis vinifera*). *Rev Inst Adolfo Lutz (Impr.)*, v.66, n.2, p:158-163, 2007.

SAHAKYANTS, T., VACANTI, J. P. Tissue engineering: from the bedside to the bench and back to the bedside. *Pediatr Surg Int*. 2020 Oct;36(10):1123-1133. DOI: 10.1007/s00383-020-04722-z. Epub 2020 Jul 30. PMID: 32734338.

TEIXEIRA, A., BAENAS, N., DOMINGUEZ-PERLES, R., BARROS, A., ROSA, E., MORENO, D. A., GARCIA-VIGUERA, C. Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* v. 15(9), p: 15638-15678, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms150915638>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/15/9/15638/htm>. Acesso em: 19 out. 2021.

WILLIAMS, D. F. **The Williams Dictionary of Biomaterials**. p: 42. Liverpool University Press, 1999.