

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Química



Tese de Doutorado

**Novas rotas químicas e físicas para o preparo de hidrogéis
baseados em polissacarídeos para potencial uso como
biomateriais**

Rafael Fonseca Neves Quadrado

Pelotas, novembro de 2023.

Rafael Fonseca Neves Quadrado

Novas rotas químicas e físicas para o preparo de hidrogéis baseados em polissacarídeos para potencial uso como biomateriais

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Fajardo

Co-orientador: Prof. Dr. Robson da Silva Oliboni

Pelotas, novembro de 2023.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

Q1n Quadrado, Rafael Fonseca Neves

Novas rotas químicas e físicas para o preparo de hidrogéis baseados em polissacarídeos para potencial uso como biomateriais [recurso eletrônico] / Rafael Fonseca Neves Quadrado ; André Ricardo Fajardo, orientador ; Robson da Silva Oliboni, coorientador. — Pelotas, 2023.
233 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Hidrogéis. 2. Polissacarídeos. 3. Rotas de reticulação. 4. Biomateriais. I. Fajardo, André Ricardo, orient. II. Oliboni, Robson da Silva, coorient. III. Título.

CDD 660.63

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

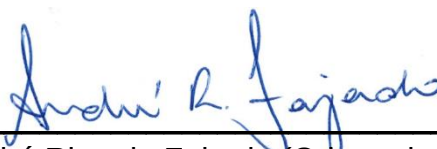
Rafael Fonseca Neves Quadrado

Novas rotas químicas e físicas para o preparo de hidrogéis baseados em polissacarídeos para potencial uso como biomateriais

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 11/12/2023

Banca examinadora:



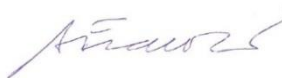
Prof. Dr. André Ricardo Fajardo (Orientador)
Doutor em Ciências pela Universidade Estadual de Maringá



Prof. Dr. Rodrigo Lambert Oréfice
Doutor em Ciências pela University of Florida



Prof. Dra. Daniela Bianchini
Doutora em Ciências pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof. Dr. André Francisco Pivato Biajoli
Doutor em Ciências pela Universidade Estadual de Campinas

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Ana por todo seu apoio, zelo e incentivo durante todo meu doutorado. Gostaria de agradecer também pelo apoio, direto e indireto, dos membros de minha família durante o doutorado.

Gostaria de agradecer meu orientador Prof. Dr. André R. Fajardo pela orientação, exemplo, amizade e apoio. Em especial, agradeço não somente pela oportunidade de realizar o doutorado sob sua orientação, mas também por ter aberto as portas da pesquisa científica, minha paixão, para mim desde os primeiros instantes em que entrei em seu laboratório. Muito obrigado.

Agradeço ao Prof. Dr. Kevin J. Edgar pela oportunidade de estágio sanduíche em seu laboratório, como também, por sua orientação e ensinamentos. Gostaria de agradecer também a Zhenghao Zhai por sua supervisão, ensinamentos e amizade.

Um agradecimento especial vai aos meus colegas de laboratório por sua amizade, apoio, ajuda e discussões. Obrigado.

Agradeço a Brady Hall pelos experimentos de cromatografia de permeação em gel.

Agradeço também ao programa de pós-graduação em química (PPGQ), a Universidade Federal de Pelotas (UFPeI) e os órgãos de fomento (CAPES e CNPQ).

RESUMO

Título: Novas rotas químicas e físicas para o preparo de hidrogéis baseados em polissacarídeos para potencial uso como biomateriais

Autor: Rafael Fonseca Neves Quadrado

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Fajardo

Palavras-chave: Hidrogéis; polissacarídeos; rotas de reticulação; biomateriais.

Hidrogéis são materiais poliméricos amplamente utilizados como biomateriais. Parte das características apresentadas por esses materiais são decorrentes do seu modo de preparo e hidrogéis com propriedades específicas ou aprimoradas podem ser obtidos ao se otimizar seu processo de obtenção. Nesta Tese, metodologias alternativas e inovadoras para preparo de hidrogéis são avaliadas e descritas. Por exemplo, uma estratégia para a obtenção de um hidrogel constituído por quitosana (QT) e um polímero sintético funcionalizado com grupos metacrilatos (PVA-MA) foi desenvolvida. O hidrogel foi formado via adição de aza-Michael utilizando o ácido bórico como catalisador. Esta nova metodologia, além de viável, permitiu a obtenção de um hidrogel robusto e mecanicamente estável. Nesse sentido, um hidrogel de pectina (Pct) reticulado por ligações dissulfeto, as quais podem ser rompidas (e refeitas) sob certas condições, foi também preparado. Logo, a metodologia resulta em um material dinâmico, responsivo e com a propriedade de *self-healing*. Um hidrogel *in situ* reticulado por ligações imina entre carboximetil quitosana (CMQT) e hidroxietil celulose funcionalizada com grupos aldeídos (HEC-Ald) foi também sintetizado. A funcionalização desse último polímero ocorreu pela inserção de grupos acetal e posterior hidrólise ácida, evitando-se a quebra da estrutura sacarídica. Por esse processo, um hidrogel com rápida gelificação, com *self-healing* e sensível ao pH foi preparado. Por fim, um hidrogel formado pela complexação polieletrólítica entre QT e Pct foi também sintetizado. O hidrogel foi preparado pelo novo método de semidissolução/acidificação, obtendo-se materiais mecanicamente estáveis e homogêneos, em contraste com o método tradicional de simples mistura das soluções, logo, revelando a eficiência do método proposto. Em resumo, nesta Tese, novas rotas de reticulação foram investigadas e sua eficiência no preparo de hidrogéis com interessantes propriedades visando sua aplicação como biomateriais foi comprovada.

ABSTRACT

Title: Novel chemical and physical routes for the synthesis of polysaccharide-based hydrogels for their potential use as biomaterials

Author: Rafael Fonseca Neves Quadrado

Advisor: Prof. Dr. André Ricardo Fajardo

Keywords: Hydrogels, polysaccharides, crosslinking routes, biomaterials.

Hydrogels are extensively used as biomaterials due to their versatile nature. The unique characteristics of hydrogels are closely tied to their crosslinking methods, and their properties can be fine-tuned by optimizing the preparation process. This thesis explores novel routes for creating hydrogels with specific properties. In the first Chapter, we introduce a fresh approach for preparing a chitosan (CHT) and methacrylated synthetic polymer (PVA-MA) hydrogel through aza-Michael crosslinking with boric acid as a catalyst. This method is not only straightforward but also results in a mechanically robust and stable hydrogel. The second Chapter details the creation of a pectin (Pct) hydrogel crosslinked by disulfide bonds, which can be broken and reformed in response to the redox conditions of the environment. This hydrogel exhibits redox responsiveness and self-healing properties, making it a potential candidate for drug release applications. Chapter three outlines the preparation of an imine-crosslinked hydrogel using carboxymethyl chitosan (CMCHT) and aldehyde-functionalized hydroxyethyl cellulose (HEC-Ald). This unique approach involves acetal grafting and subsequent acid hydrolysis to reveal the aldehydes, ensuring saccharide monomer preservation. The resulting hydrogel possesses in situ forming capabilities, self-healing properties, and pH-responsiveness. The final chapter presents a hydrogel formed through polyelectrolyte complexation between QT and Pct. This hydrogel is prepared using a novel semi-dissolution/acidification method, resulting in mechanically stable and uniform materials, highlighting the efficiency of this approach. In summary, this thesis investigates novel crosslinking methods and demonstrates their effectiveness in producing hydrogels with valuable properties for biomedical applications.

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema ilustrativo de uma rede polimérica de um hidrogel.....	25
Figura 2	Estrutura química da unidade monomérica da celulose.....	30
Figura 3	Estrutura química da parte linear da pectina (grau de desacetilação de 100%).....	31
Figura 4	Estrutura química da unidade monomérica da quitosana.....	33
Figura 5	Esquema ilustrativo da reação de funcionalização do PVA com grupos metacrilatos e a obtenção do PVA-MA.....	38
Figura 6	Esquema ilustrativo para a síntese do hidrogel QT/PVA-MA usando H_3BO_3 como catalisador.....	43
Figura 7	Solução polimérica contendo 0,4 % m/m de H_3BO_3	47
Figura 8	Valores de $\tan \delta$ para as soluções preparada em cada condição reportada na respectiva entrada na Tabela X. Os valores do desvio padrão não foram mostrados para facilitar a visualização.....	48
Figura 9	Espectros de FTIR (a), RMN de 1H (b) e ^{13}C (c) da QT, PVA-MA e do hidrogel QT/PVA-MA.....	51
Figura 10	Espectros de RMN de ^{13}C do meio de reação na ausência e na presença de H_3BO_3	53
Figura 11	Mecanismo proposto para a síntese do hidrogel utilizando H_3BO_3 como catalisador.....	56
Figura 12	Curvas de TG (a) e DTG (b) da QT, do PVA-MA e do hidrogel QT/PVA-MA.....	57
Figura 13	Curvas dos módulos G' e G'' em função da frequência (a) e curva tensão-deformação (b) do hidrogel QT/PVA-MA.....	59
Figura 14	Curvas de intumescimento do hidrogel QT/PVA-MA (a) e perda de massa (b) do hidrogel QT/PVA-MA em PBS (pH 7,4) na	

	temperatura de 37 °C. O <i>inset</i> mostra o intumescimento máximo do hidrogel em diferentes condições de pH.....	60
Figura 15	Imagens de MEV do hidrogel QT/PVA-MA preparado em diferentes magnificações.....	62
Figura 16	Esquema geral da reação de funcionalização da Pct com grupos tióis.....	67
Figura 17	Espectros de FTIR (a) e RMN de ^1H (b) da Pct e Pct-SH.....	71
Figura 18	Tempos de gelificação das soluções de Pct-SH por meio do teste de inversão do tubo reacional.....	74
Figura 19	Percentual de gelificação (a) e $\tan \delta$ em função do tempo de reação (b) dos hidrogéis preparados em diferentes condições experimentais.....	75
Figura 20	Espectros de FTIR dos hidrogéis obtidos a partir de soluções de Pct-SH com concentração de 5% (a), 10% (b) e 15% m/m (c) e diferentes quantidades de KPS.....	77
Figura 21	Módulos G' e G'' dos hidrogéis Pct-SH ₍₅₋₁₎ (a), Pct-SH ₍₅₋₂₎ (b), Pct-SH ₍₅₋₃₎ (c), Pct-SH ₍₁₀₋₁₎ (d), Pct-SH ₍₁₀₋₂₎ (e), Pct-SH ₍₁₀₋₃₎ (f), Pct-SH ₍₁₅₋₁₎ (g), Pct-SH ₍₁₅₋₂₎ (h) e Pct-SH ₍₁₅₋₃₎ (i).....	81
Figura 22	Intumescimento máximo dos hidrogéis Pct-SH preparados em meio PBS (pH 7,4) na temperatura constante de 37 °C.....	84
Figura 23	Curvas da perda de massa dos hidrogéis Pct-SH preparados com diferentes concentrações de Pct-SH de 5 % m/m (a), 10 % m/m (b) e 15 % m/m (c) em meio PBS (pH 7,4) na temperatura de 37 °C.....	85
Figura 24	Curvas da perda de massa dos hidrogéis Pct-SH preparados com diferentes concentrações de Pct-SH de 5 % m/m (a), 10 % m/m (b) e 15 % m/m (c) em meio PBS (pH 7,4) suplementado com GSH (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na temperatura de 37 °C.....	86
Figura 25	Curvas da perda de massa dos hidrogéis Pct-SH preparados com diferentes concentrações de Pct-SH de 5 % m/m (a), 10 % m/m (b) e 15 % m/m (c) em meio PBS (pH 7,4) suplementado com Cyst (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na temperatura de 37 °C.....	87

Figura 26	Experimento de extrusão realizado para investigar a injetabilidade dos hidrogéis Pct-SH (a) e o mecanismo proposto para o processo de <i>self-healing</i> observado nos hidrogéis (b).....	91
Figura 27	Espectros de FTIR dos hidrogéis Pct-SH ₍₅₋₁₎ , Pct-SH ₍₅₋₂₎ e Pct-SH ₍₅₋₃₎ antes e depois do processo de <i>self-healing</i>	92
Figura 28	Módulos de Young dos hidrogéis antes e após o processo de extrusão pela seringa.....	93
Figura 29	Curvas liberação de ACT dos hidrogéis Pct-SH com diferentes concentrações de Pct-SH de 5 % m/m (a), 10 % m/m (b) e 15 % m/m (c) em meio PBS (pH 7,4) na temperatura de 37 °C.....	94
Figura 30	Curvas da liberação de ACT dos hidrogéis Pct-SH preparados com diferentes concentrações de Pct-SH de 5 % m/m (a), 10 % m/m (b) e 15 % m/m (c) em meio PBS (pH 7,4) suplementado com GSH (10 µmol L ⁻¹) na temperatura de 37 °C.....	95
Figura 31	Curvas da liberação de ACT dos hidrogéis Pct-SH preparados com diferentes concentrações de Pct-SH de 5 % m/m (a), 10 % m/m (b) e 15 % m/m (c) em meio PBS (pH 7,4) suplementado com Cyst (10 µmol L ⁻¹) na temperatura de 37 °C.....	96
Figura 32	Espectros de RMN de ¹ H da HEC e HEC-Acetal em D ₂ O.....	114
Figura 33	Espectros de RMN de ¹ H dos produtos HEC-Ald hidrolisados em diferentes condições em D ₂ O. O <i>inset</i> mostra a região do espectro típica do sinal do próton α do grupo aldeído.....	116
Figura 34	Espectro de RMN de ¹ H do produto da reação entre HEC-Ald e <i>tert</i> -butilamina em D ₂ O.....	117
Figura 35	Espectro de RMN de ¹ H da CMQT sintetizada em D ₂ O.....	118
Figura 36	Esquema ilustrativo do processo de preparo do hidrogel HEC-Ald/CMQT (a) e condições experimentais empregadas para o preparo do hidrogel (b).....	120
Figura 37	Curva dos módulos <i>G'</i> e <i>G''</i> em função do tempo da solução precursora do hidrogel HEC-Ald/CMQT (a) e espectros de FTIR do hidrogel, HEC-Ald e CMQT (b).....	123
Figura 38	Módulos <i>G'</i> e <i>G''</i> do hidrogel HEC-Ald/CMQT em função da deformação (a) e frequência (b). Curva de relaxamento de	

	tensão (c) e curvas de fluência-recuperação (d) do hidrogel HEC-Ald/CMQT.....	126
Figura 39	Fotografias dos testes qualitativos para demonstrar a gelificação <i>in situ</i> do hidrogel HEC-Ald/CMQT. Sistema de injeção utilizado (a) para promover a extrusão das soluções dos polissacarídeos em água na temperatura de 37 °C (b,c). O hidrogel também foi formado diretamente em membranas de colágeno em condições “secas” (d) e “úmidas” (e).....	132
Figura 40	Capacidade de <i>self-healing</i> do hidrogel HEC-Ald/CMQT, onde amostras do hidrogel foram preparadas (a), cortadas (b) e colocada em contato (c). Imediatamente, adesão ocorre entre as amostras na interface de contato e as amostras são fundidas em uma única peça posteriormente (d).....	133
Figura 41	Curvas de variação da deformação do hidrogel HEC-Ald/CMQT, onde a deformação de 1% até 250% em intervalos de 3 min.....	134
Figura 42	Intumescimento (a) e perda de massa (b) do hidrogel HEC-Ald/CMQT em diferentes condições de pH. Os experimentos foram realizados na temperatura de 37 °C.....	135
Figura 43	Curvas de liberação da VN do hidrogel HEC-Ald/CMQT em meio tampão com pH 1,2, pH 5,2 e pH 7,4. Os experimentos de liberação foram realizados na temperatura de 37 °C.....	137
Figura 44	Ensaio de viabilidade celular com diferentes concentrações do hidrogel HEC-Ald/CMQT.....	141
Figura 45	Esquema ilustrativo do preparo dos hidrogéis PEC-vap pelo método de semidissolução/acidificação.....	151
Figura 46	Imagens fotográficas dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv preparados.....	153
Figura 47	Espectros de FTIR dos hidrogéis PEC-vap (a) e PEC-conv (b), e a comparação direta dos mesmos (c).....	154
Figura 48	Curvas de DSC da QT e Pct (a) e dos hidrogéis PEC-vap (b) e PEC-conv (c).....	160

Figura 49	Curvas de TG e DTG da QT e Pct (a,b) e dos hidrogéis PEC-Vap (c,d) e PEC-conv (e,f).....	164
Figura 50	Estruturas dos hidrogéis obtidos pelo método convencional e pelo método de semidissolução/acidificação.....	166
Figura 51	Difratogramas de raio-X da QT, Pct e dos hidrogéis PEC-conv e PEC-vap preparados com diferentes razões de massa entre QT e Pct.....	167
Figura 52	Grau de intumescimento máximo dos hidrogéis PEC-conv e PEC-vap preparados com diferentes razões mássicas QT:Pct em água destilada.....	173
Figura 53	Intumescimento máximo dos hidrogéis PEC-conv (a) e PEC-vap (b) em água destilada com diferentes condições de pH.....	175
Figura 54	Intumescimento máximo dos hidrogéis PEC-conv (a) e PEC-vap (b) em diferentes concentrações de NaCl.....	177
Figura 55	Curvas da perda de massa dos hidrogéis PEC-conv (a) e PEC-vap (b) em PBS (pH 7,4).....	180
Figura 56	Liberação de CUR dos hidrogéis PEC-conv (a) e PEC-vap (b) em PBS (pH 7,4) na temperatura constante de 37 °C.....	183

Lista de Equações

Equação 1	Rendimento da síntese do hidrogel.....	39
Equação 2	Intumescimento do hidrogel.....	41
Equação 3	Perda de massa do hidrogel.....	41
Equação 4	Peso molecular médio entre os pontos de reticulação.....	41
Equação 5	Fração volumétrica da rede polimérica intumescida.....	41
Equação 6	Parâmetro de interação polímero-solvente.....	41
Equação 7	Densidade de reticulação.....	41
Equação 8	Equilíbrio das espécies do H_3BO_3 em água.....	46
Equação 9	Grau de substituição (DS) da Pct-SH.....	72
Equação 10	Modelo cinético de Lagergren.....	97
Equação 11	Modelo cinético de Korsmeyer-Peppas.....	99
Equação 12	Grau de substituição (DS) do HEC-Acetal.....	105
Equação 13	Conversão dos grupos acetal para grupos aldeído.....	105
Equação 14	Grau de substituição (DS) do HEC-Ald.....	106
Equação 15	Grau de substituição (DS) da HEC-Ald com <i>tert</i> -butilamina....	106
Equação 16	Grau de substituição (DS) da carboximetilação na posição 6,3-O da CMQT.....	107
Equação 17	Grau de substituição (DS) da carboximetilação na posição 2-N da CMQT.....	108
Equação 18	Relação entre o módulo G' no equilíbrio e densidade de reticulação.....	121
Equação 19	Modelo de Maxwell.....	127
Equação 20	Atividade de partição da VN entre o hidrogel e o meio de liberação.....	138
Equação 21	Modelo cinético de partição de primeira ordem.....	138
Equação 22	Modelo cinético de partição de segunda ordem.....	138
Equação 23	Encapsulação da CUR nos hidrogéis preparados.....	149

Lista de Esquemas

Esquema 1	Reação de funcionalização da HEC com grupos acetal e sua hidrólise.....	112
-----------	---	-----

Lista de Tabelas

Tabela 1	Tempo de gelificação e rendimento para a síntese do hidrogel QT/PVA-MA em diferentes condições.....	43
Tabela 2	Estágios de perda de massa da QT, PVA-MA e do hidrogel QT/PVA-MA preparado.....	57
Tabela 3	Formulação e nomenclatura dos hidrogéis Pct-SH preparado..	68
Tabela 4	Tempos de gelificação e densidade de reticulação dos hidrogéis Pct-SH preparados.....	76
Tabela 5	Propriedades mecânicas dos hidrogéis Pct-SH preparados.....	82
Tabela 6	Constantes cinéticas da degradação dos hidrogéis Pct-SH preparados em diferentes condições experimentais.....	88
Tabela 7	Parâmetros cinéticos da liberação de ACT dos hidrogéis Pct-SH preparados.....	98
Tabela 8	Formulações utilizadas para o preparo do hidrogel HEC-Ald/CMQT.....	108
Tabela 9	Condições experimentais testadas e resultados da síntese da HEC-Acetal.....	113
Tabela 10	Concentração de cadeias elásticas (ν_e) estimadas para os hidrogéis preparados.....	122
Tabela 11	Tempos de relaxamento observados para diferentes hidrogéis baseados em polissacarídeos.....	129
Tabela 12	Parâmetros cinéticos da liberação de VN do hidrogel HEC-Ald/CMQT.....	139
Tabela 13	Formulações dos hidrogéis QT:Pct preparados.....	147
Tabela 14	Modelos cinéticos utilizados para investigar a liberação de CUR dos hidrogéis preparados.....	150
Tabela 15	Principais bandas observadas nos espectros de FTIR dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv.....	158
Tabela 16	Temperatura e entalpia (ΔH) dos picos endotérmicos e exotérmicos observados nas curvas de DSC dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv.....	163
Tabela 17	Densidade de reticulação dos hidrogéis PEC-conv e PEC-vap.	171
Tabela 18	Propriedades mecânicas dos hidrogéis PEC-vap preparados...	173

Tabela 19	Quantidade de curcumina (CUR) encapsulada nos hidrogéis PEC-conv e PEC-vap.....	183
Tabela 20	Parâmetros cinéticos da liberação de curcumina (CUR) dos hidrogéis PEC-conv e PEC-vap.....	186

Lista de abreviaturas

3D: Tridimensional
AGU: Unidade anidroglicose
AcOH: Ácido acético
Cur: Curcumina
CMQT: Carboximetil quitosana
CL: Celulose
Cyst: L-cisteína
DRX: Difração de raio-X
DS: Grau de substituição
DNTB: Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
DSS: Trimetilsililpropanossulfonato de sódio
DSC: Calorimetria exploratória diferencial
DTG: Termogravimetria derivativa
EDC: Cloridrato de 1-etil-3-carbodimida
FTIR: Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GMA: Metacrilato de glicidila
G': Módulo de armazenamento (elástico)
G'': Módulo de perda (viscoso)
GSH: Glutathione reduzida
HEC: Hidroxietil celulose
HEC-Acetal: Hidroxietil celulose funcionalizada com grupos acetal
HEC-Ald: Hidroxietil celulose funcionalizada com grupos aldeído
KPS: Persulfato de potássio
M_v: Peso molecular viscosimétrico médio
M_w: Peso molecular médio
MS: Grau de substituição molar
MEV: Microscopia eletrônica de varredura
PBS: Tampão fosfato

PVA: Poli(vinil álcool)

PVA-MA: PVA metacrilatado

Pct: Pectina

Pct-SH: Pectina funcionalizada com grupos tióis

PEC: Complexo polieletrólítico

PEC-vap: Complexo polieletrólítico preparado pelo método de semidissolução/acidificação

PEC-conv: Complexo polieletrólítico preparado pelo método convencional

QT: Quitosana

RMN: Ressonância magnética nuclear

TG: Termogravimetria

VN: Vanilina

Sumário

Capítulo 1 – Introdução e objetivos.....	20
1.1. Introdução.....	20
1.2. Objetivos.....	21
1.2.1. Objetivo geral.....	21
1.2.2. Objetivos específicos.....	21
Capítulo 2 – Revisão bibliográfica	23
2.1. Biomateriais poliméricos	23
2.2. Hidrogéis	24
2.3. Polissacarídeos	28
2.3.1. Celulose.....	29
2.3.2. Pectina.....	30
2.3.3. Quitosana.....	32
Capítulo 3 – Hidrogel de quitosana preparado por meio de uma nova estratégia de reticulação catalisada por ácido bórico: Desenvolvimento, síntese e caracterização.....	35
3.1. Introdução.....	35
3.2. Experimental.....	37
3.2.1. Materiais.....	37
3.2.2. Funcionalização química do PVA utilizando GMA.....	37
3.2.3. Preparo do hidrogel QT/PVA-MA.....	38
3.2.4. Técnicas de caracterização.....	40
3.3. Resultados e discussão.....	42
3.3.1. Síntese do hidrogel QT/PVA-MA.....	42
3.3.1.1. Investigação do mecanismo de gelificação	49
3.3.2. Caracterização do hidrogel QT/PVA-MA.....	56
3.3.2.1. Propriedades térmicas.....	56
3.3.2.2. Propriedades mecânicas.....	58
3.3.2.3. Intumescimento e estabilidade.....	59
3.3.2.4. Morfologia.....	61
3.4. Conclusão.....	62
Capítulo 4 – Hidrogéis de pectina reticulados com ligações dissulfeto: Potenciais veículos redox-responsivos para liberação de fármacos.....	64

4.1. Introdução.....	64
4.2. Experimental.....	66
4.2.1. Materiais.....	66
4.2.2. Funcionalização da pectina (Pct) com grupos tióis.....	66
4.2.3. Quantificação espectrofotométrica dos grupos tióis livres.....	67
4.2.4. Preparo do hidrogel quimicamente reticulado por ligações dissulfeto.....	67
4.2.5. Técnicas de caracterização.....	68
4.2.6. Encapsulação e liberação de acetaminofeno (ACT).....	69
4.3. Resultados e discussão.....	69
4.3.1. Obtenção da Pct quimicamente funcionalizada com grupos tióis.....	69
4.3.2. Formação dos hidrogéis Pct-SH.....	73
4.3.3. Caracterização dos hidrogéis Pct-SH.....	79
4.3.3.1. Propriedades mecânicas.....	79
4.3.3.2. Intumescimento e degradação.....	83
4.3.3.3. Injetabilidade e <i>self-healing</i>	89
4.3.4. Liberação controlada de acetaminofeno (ACT).....	93
4.4. Conclusão.....	100
Capítulo 5 – Hidrogel de carboximetil quitosana e hidroxietil celulose funcionalizada com grupos aldeídos com potencial aplicação para liberação controlada de fármacos.....	102
5.1. Introdução.....	102
5.2. Experimental.....	103
5.2.1. Materiais.....	104
5.2.2. Procedimento geral para a síntese e desproteção ácida da hidroxietil celulose funcionalizada com grupos acetal (HEC-Acetal).....	104
5.2.3. Identificação e quantificação dos grupos aldeído na HEC-Ald.....	106
5.2.4. Síntese d carboximetil quitosana (CMQT).....	107
5.2.5. Procedimento geral para o preparo dos hidrogéis HEC-Ald/CMQT.....	108
5.2.6. Técnicas de caracterização.....	108
5.2.7. Encapsulação e ensaio de liberação <i>in vitro</i>	110
5.2.8. Ensaio de viabilidade celular.....	111
5.3. Resultados e discussão.....	111
5.3.1. Otimização da síntese e desproteção ácida da HEC-Acetal.....	111

5.3.2. Síntese da CMQT.....	117
5.3.3. Preparo do hidrogel HEC-Ald/CMQT.....	119
5.3.4. Propriedades mecânicas do hidrogel HEC-Ald/CMQT.....	124
5.3.5. Injetabilidade e <i>self-healing</i> do hidrogel preparado.....	130
5.3.6. Intumescimento e perda de massa do hidrogel HEC-Ald/CMQT.....	134
5.3.7. Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	136
5.3.8. Ensaio de viabilidade celular.....	140
5.4. Conclusão.....	141
Capítulo 6 – Hidrogel preparado por complexação polieletrólítica utilizando um método de semidissolução/acidificação: Síntese, caracterização e aplicação na liberação de fármacos.....	143
6.1. Introdução.....	143
6.2. Experimental.....	146
6.2.1. Materiais.....	146
6.2.2. Preparo dos hidrogéis fisicamente reticulados.....	146
6.2.3. Técnicas de caracterização.....	149
6.2.4. Encapsulação e liberação de curcumina (CUR).....	149
6.3. Resultados e discussão.....	150
6.3.1. Preparo dos hidrogéis.....	151
6.3.2. Caracterização dos hidrogéis.....	154
6.3.2.1. Propriedades mecânicas.....	172
6.3.2.2. Intumescimento.....	173
6.3.2.3. Estabilidade.....	180
6.3.2.4. Encapsulação e liberação controlada de CUR.....	182
6.4. Conclusão.....	187
Capítulo 7 – Considerações finais.....	189
Referências.....	190
Apêndices.....	209
Apêndice A – Informações complementares do Capítulo 3.....	210
Apêndice B – Informações complementares do Capítulo 4.....	217
Apêndice C – Informações complementares do Capítulo 5.....	227
Apêndice D – Informações complementares do Capítulo 6.....	233

Capítulo 1 – Introdução e objetivos

1.1. Introdução

Hidrogéis compõem uma classe de materiais poliméricos constituídos por uma rede tridimensional (3D) formada por polímeros hidrofílicos reticulados (Zhu *et al.*, 2019). Esta rede 3D é capaz de absorver e reter uma grande quantidade de líquido sem dissolver ou perder a sua integridade estrutural (Hu *et al.*, 2019a). Essas características instigam o uso desses materiais em uma vasta gama de aplicações (Hu *et al.*, 2019a). Em particular, o interesse no desenvolvimento e aplicação de hidrogéis como biomateriais cresceu exponencialmente nas últimas décadas. De fato, os hidrogéis têm sido peça chave na fabricação de novos sistemas para cultivo celular, engenharia de tecidos, liberação controlada de fármacos e agentes biológicos, curativos, entre outros (Zhu *et al.*, 2019). Nesse contexto, o preparo de hidrogéis utilizando polissacarídeos é muito atrativo por conta da baixa toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e sustentabilidade dessa classe de polímeros; propriedades fundamentais para um potencial biomaterial (Gholamali, 2019). Entre os diversos polissacarídeos utilizados no preparo de hidrogéis visando esse tipo de aplicação, uma vasta gama de estudos na literatura emprega quitosana, pectina ou celulose (e seus derivados) como matéria-prima para a síntese desses materiais, basicamente por conta das propriedades biológicas desses polímeros (Gholamali, 2019).

Nos últimos anos, o principal objetivo das pesquisas envolvendo hidrogéis constituídos por polissacarídeos foca no seu preparo e aplicação. Assim, o preparo dos hidrogéis é modulado para atender as expectativas da sua futura aplicação (George *et al.*, 2020a). Um dos aspectos mais importantes no preparo desses materiais é o tipo de metodologia de reticulação aplicada na formação da rede 3D, onde as rotas de reticulação de natureza química ou física são predominantemente empregadas (Hu *et al.*, 2019a). Na reticulação química, as cadeias do polissacarídeo são unidas entre si por meio de ligações covalentes, enquanto, na reticulação física, interações não-covalentes (atração iônica/eletrostática, ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas, por exemplo) são responsáveis pelo entrelaçamento das cadeias (Hu *et al.*, 2019a). Cada rota de reticulação, química ou física, resulta em hidrogéis com diferentes

propriedades e sua seleção depende, exclusivamente, da aplicação final desses materiais (Zhu *et al.*, 2019).

Por exemplo, hidrogéis quimicamente reticulados são materiais muito estáveis, logo, sendo empregados em aplicações biomédicas que requerem uma grande estabilidade e robustez mecânica. Todavia, por conta da rede tridimensional reticulada por ligações covalentes irreversíveis, o uso desses materiais como sistemas de liberação controlada, por exemplo, é limitado. Nesse sentido, hidrogéis quimicamente reticulados por ligações covalentes dinâmicas, que podem ser quebradas e formadas novamente mediante um estímulo externo (mudança no pH, temperatura, entre outros fatores), podem ser empregados para essa aplicação (Zhu *et al.*, 2019). Nesse mesmo tipo de aplicação, hidrogéis formados *in situ* são muito interessantes, uma vez que esses materiais são sintetizados na região de interesse e, como consequência, a ação do fármaco liberado do material é máxima (Zhu *et al.*, 2019). Por outro lado, hidrogéis fisicamente reticulados são ideias para o preparo de sistemas de liberação controlada pois o uso de reticulantes químicos ou a funcionalização dos polímeros utilizados são evitados nessa rota de reticulação. Todavia, o uso de materiais fisicamente reticulados para liberação controlada de fármacos é restrita por causa da fragilidade e heterogeneidade desses materiais (Zhu *et al.*, 2019).

Tendo em vista todos esses aspectos, o desenvolvimento de metodologias eficientes para o preparo de hidrogéis utilizando polissacarídeos é de extrema importância. Por sua vez, essas metodologias devem ser constituídas de rotas viáveis de reticulação, química ou física, dos polissacarídeos. Ademais, é imprescindível que tais rotas de preparo possam introduzir certas propriedades aos hidrogéis obtidos visando a sua aplicação final como biomaterial. Dessa forma, esta Tese apresenta novas estratégias de reticulação e preparo de hidrogéis baseados em polissacarídeos visando o atendimento dessas expectativas. Nesta Tese, os polissacarídeos quitosana, pectina ou celulose foram empregados como materiais de partida dos hidrogéis e a potencial aplicação dos hidrogéis preparados como biomateriais foi investigada.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Desenvolver e viabilizar novas rotas químicas ou físicas para o preparo de hidrogéis baseados nos polissacarídeos quitosana, pectina ou celulose e investigar o potencial uso desses hidrogéis como biomateriais.

1.2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver metodologias eficientes para o preparo de hidrogéis a partir de polissacarídeos;
- Desenvolver metodologias eficazes para a funcionalização química dos polissacarídeos utilizados no preparo dos hidrogéis;
- Investigar os mecanismos da formação dos hidrogéis;
- Obter hidrogéis com propriedades (físico-químicas, morfológicas e de intumescimento) adequadas para uso como biomateriais e avaliar o efeito do processo de reticulação sobre estas;
- Avaliar o potencial dos hidrogéis preparados como biomateriais (por exemplo, como curativos ou sistemas de liberação controlada de compostos biologicamente ativos).

Capítulo 2 – Revisão bibliográfica

2.1. Biomateriais poliméricos

Em geral, o termo “biomaterial” é utilizado para todo “material empregado no contato com tecidos vivos, organismos ou micro-organismos” (IUPAC, 2012). Essa definição é empregada desde sua recomendação pela IUPAC em 2012 e, apesar de prática, é ampla e engloba materiais que não são notoriamente considerados biomateriais. Por exemplo, bisturis, agulhas e sondas (nasogástrica, nasoenteral, retal, entre outras) podem ser equivocadamente definidos como biomateriais segundo essa definição. Isso ocorre, pois, o papel biológico ativo dos biomateriais não é claramente considerado. Por conta disso, outra definição do termo “biomaterial”, mais complexa, tem sido utilizada nos últimos anos. Um biomaterial é uma substância, de origem natural ou não, desenvolvida com uma forma específica para, sozinha ou como parte de um sistema mais complexo, direcionar ou influenciar, por meio de interações com os tecidos vivos, o curso de qualquer processo terapêutico ou de diagnóstico (Williams, 2014). Nessa definição, existe grande ênfase no desenvolvimento “planejado” do material e sua forma, ou seja, o biomaterial é projetado com as propriedades compatíveis com sua aplicação, a qual deve, mandatoriamente, contribuir no tratamento (ou diagnóstico) do paciente (Williams, 2009). Em ambas as definições citadas, o biomaterial possui uma interface de contato com os sistemas biológicos (tecidos vivos, células e estruturas celulares) para sua avaliação, tratamento ou, ainda, substituição (Aeridou *et al.*, 2020). Nesse contexto, alguns exemplos de materiais que podem ser citados como biomateriais são lentes de contato, próteses, implantes, enxertos, marcapassos, cateteres, *stents*, substratos para engenharia de tecidos, dispositivos de liberação controlada de fármacos, entre outros (Hu *et al.*, 2019b).

Levando em consideração a extensa lista de biomateriais, um parâmetro fundamental é a biocompatibilidade desses materiais com sistemas biológicos. Dessa forma, biocompatibilidade pode ser caracterizada como a capacidade do material em executar sua “função planejada” em uma aplicação específica com uma resposta apropriada do sistema biológico (Williams, 2014). Nesse caso, sistema biológico é utilizado como um termo genérico que inclui tecidos vivos humanos e de outros animais (equinos, ruminantes e animais domésticos, por

exemplo) (Williams, 2014). Em outras palavras, a execução da função planejada do biomaterial em relação à terapia ou diagnóstico almejado, com efeitos adversos locais ou sistêmicos mínimos, e a geração de um efeito que beneficia o sistema biológico alvo é definida como biocompatibilidade (Williams, 2022). Isso implica que não existem materiais totalmente inertes, já que há uma resposta a qualquer substância estranha em contato ou inserida em um tecido vivo (Williams, 2022). Uma forma eficiente para regular e/ou minimizar a resposta do tecido vivo ao contato com o biomaterial é manipular a composição do mesmo (PEPPAS, 2016). A partir dessa perspectiva, o desenvolvimento de biomateriais com base em polímeros tem proporcionado um grande avanço nesta área, já que essas macromoléculas são versáteis e possuem várias propriedades físico-químicas atrativas para esse fim (Abbasian *et al.*, 2019). De fato, diversos trabalhos na literatura relatam o desenvolvimento e aplicação de biomateriais poliméricos com diversos formatos e dimensões (ABBASIAN *et al.*, 2019; CHEN; ZHAI; EDGAR, 2022). Exemplos de biomateriais poliméricos na forma de dispersão sólida, nanopartículas, micropartículas, membranas, fibras, filmes e géis são frequentemente encontrados na literatura (Fu *et al.*, 2018). Em especial, um corpo expressivo da produção científica nessa área é focado em hidrogéis poliméricos e seu uso como biomaterial em diferentes aplicações, basicamente devido às características únicas desse tipo de material (Abbasian *et al.*, 2019). Constatado isso, pode ser inferido que os hidrogéis são peça-chave no desenvolvimento de novos biomateriais para atuar como sistemas para cultivo de células (*scaffolds*), curativos, testes celulares, dispositivos para liberação controlada de fármacos, entre outros (Daly *et al.*, 2020). A descrição das principais características dessa classe de materiais poliméricos é feita na próxima seção.

2.2. Hidrogéis

Hidrogéis são materiais poliméricos formados por uma rede de polímeros hidrofílicos capazes de absorver e reter grandes quantidades de água ou fluídos biológicos sem perder sua estrutura 3D (Hu *et al.*, 2019b). Essa propriedade advém do fato que as cadeias poliméricas estão reticuladas umas às outras através de zonas de junção, denominadas de pontos de reticulação, que

asseguram sua estabilidade. Por conta dessa topologia, a rede polimérica reticulada dos hidrogéis apresenta vários interstícios que são ocupados pelas moléculas do solvente, especialmente no estado intumescido (HU *et al.*, 2019). Portanto, à medida que esses materiais intumescem, moléculas de diferentes tamanhos podem difundir através da rede 3D. A existência da difusão de fluídos e solutos, como também, ao grande conteúdo de água, consistência macia e elasticidade, tornam os hidrogéis muito parecidos com os tecidos vivos. Essa similaridade resulta em uma maior compatibilidade dos hidrogéis com os tecidos do corpo humano em comparação com outras classes de biomateriais (CHEN *et al.*, 2020). A estrutura geral da rede 3D característica dos hidrogéis é ilustrada na **Figura 1**.

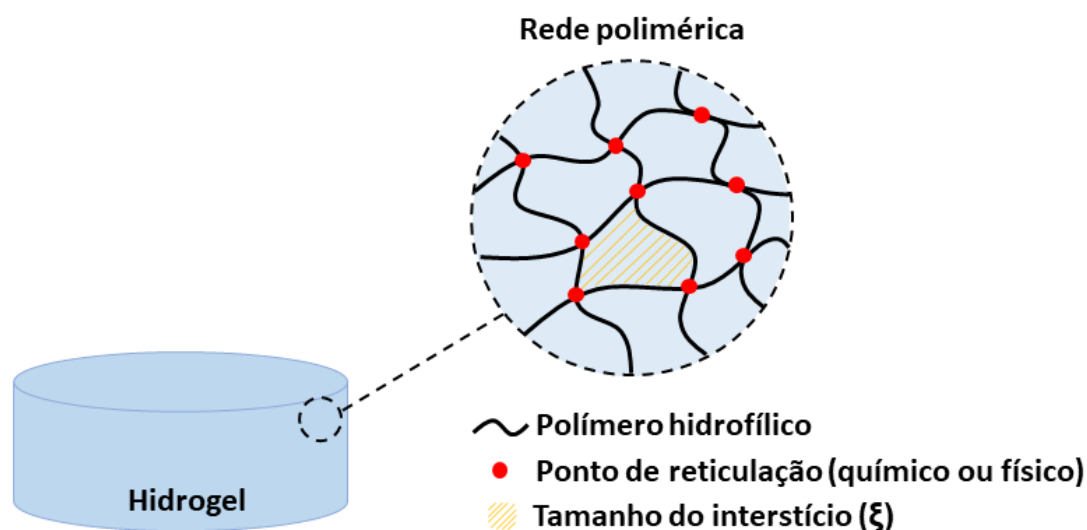


Figura 1. Esquema ilustrativo da rede polimérica constituinte de um hidrogel.

A reticulação das cadeias poliméricas que formam a rede 3D dos hidrogéis pode ocorrer por meio químico ou físico (Hu *et al.*, 2019a). Dessa forma, as características dos hidrogéis depende da natureza dos seus pontos de reticulação. Na reticulação química, as cadeias poliméricas são unidas entre si por meio de ligações covalentes, as quais são, geralmente, irreversíveis (George *et al.*, 2020a). Já na reticulação física, a rede polimérica é formada por interações não-covalentes, como, por exemplo, atração iônica/eletrostática, ligação de hidrogênio, cristalização ou interações hidrofóbicas entre as cadeias poliméricas (Hu *et al.*, 2019a). Essas distinções resultam em diferentes metodologias de

preparo para cada tipo de hidrogel. Hidrogéis quimicamente reticulados podem ser formados pelo uso de agentes químicos específicos responsáveis pela reticulação. Entretanto, grande parte dessas espécies químicas possuem uma elevada toxicidade e, por conta disso, essa rota de preparo é preterida por diversos pesquisadores (Zhang, Junmei Zhi Junji *et al.*, 2019). Uma estratégia comumente empregada para a formação de hidrogéis quimicamente reticulados é a funcionalização química dos polissacarídeos pela inserção de grupos funcionais em sua estrutura que possibilitam a reticulação química por diferentes tipos de reações orgânicas (por exemplo, reação de Diels-Alder, adição de Michael, adição azida-alcino, etc.) (Akhtar; Hanif; Ranjha, 2016). Em relação aos hidrogéis fisicamente reticulados, estes podem ser preparados por várias metodologias (Gholamali, 2019). A mais usual é a mistura de soluções de polissacarídeos que possuem grupos funcionais eletricamente carregados ou que, em uma condição específica, apresentem cargas elétricas (por exemplo, devido à variação de pH) (Zhang, Junmei Zhi Junji *et al.*, 2019). Especificamente, quando polímeros de cargas opostas são misturados, em solução, ocorre a formação de complexos polieletrólíticos (PEC) por conta da forte atração eletrostática entre as cargas opostas (Şen *et al.*, 2017). Todavia, essa metodologia frequentemente resulta em membranas ou filmes (materiais 2D). Apesar disso, essa metodologia é vantajosa, uma vez que não faz uso de agentes de reticulação (Zhang, Junmei Zhi Junji *et al.*, 2019).

Obviamente, cada tipo de hidrogel (físico ou químico) apresenta certas propriedades que norteiam sua aplicação como biomaterial. Tais especificidades são originadas diretamente da rota de reticulação utilizada para seu preparo. Hidrogéis químicos, por exemplo, possuem uma grande estabilidade química e mecânica por conta das ligações covalentes que compõem a sua rede polimérica (Akhtar; Hanif; Ranjha, 2016). Essas ligações são, em geral, fortes e permitem a manutenção da estrutura geral do hidrogel sob estresse mecânico. Por conta disso, esse tipo de hidrogel tem sido utilizado como biomaterial em aplicações mais robustas, como no revestimento de ferimentos (atuando como curativos) ou em implantes (Akhtar; Hanif; Ranjha, 2016). Por outro lado, hidrogéis físicos, cuja rede polimérica é formada por interações reversíveis frente a mudanças no ambiente externo (pH, temperatura, força iônica, entre outros), são amplamente

aplicados como sistemas de liberação controlada de fármacos e agentes biológicos (Fajardo *et al.*, 2012b). Porém, essa estratégia de preparo de hidrogéis, geralmente, resulta em materiais heterogêneos devido a formação de zonas com diferentes graus de reticulação durante o processo de reticulação. Dessa forma, heterogeneidades são criadas no material (Gholamali, 2019).

Evidentemente, todas as propriedades associadas aos hidrogéis químicos e físicos podem ser ampliadas e otimizadas pela adoção de estratégias de preparo modificadas em relação aos protocolos tradicionais. Consequentemente, as potenciais aplicações desses materiais são expandidas. Por exemplo, a rede polimérica de hidrogéis quimicamente reticulados pode ser formada por ligações covalentes dinâmicas entre os polímeros. Essas ligações podem ser quebradas e, então, reconstituídas (Liu *et al.*, 2019). Essa capacidade permite a formação de hidrogéis quimicamente reticulados capazes de responder a certos estímulos externos e internos (uma propriedade típica de hidrogéis físicos), mas mantendo as boas propriedades mecânicas características da reticulação química (ZHANG, J. Z. *et al.*, 2019). Similarmente, hidrogéis físicos podem apresentar duas redes poliméricas, uma fisicamente e a outra quimicamente reticulada. Em geral, a sinergia entre os dois tipos de reticulação proporciona uma melhora expressiva nas propriedades mecânicas dos hidrogéis físicos tradicionais. Tais hidrogéis híbridos podem ser utilizados em aplicações que demandam uma grande robustez mecânica e estabilidade estrutural (Wu *et al.*, 2018).

A variabilidade de estratégias de reticulação possíveis para o preparo de hidrogéis e suas respectivas particularidades resulta na utilização da aplicação final desses materiais como “ponto guia” para a seleção da rota de reticulação e de seu método de preparo. Em outra perspectiva, mas considerando a aplicação de hidrogéis como biomateriais, o uso de polímeros naturais para o preparo desses materiais é muito vantajoso (GEORGE *et al.*, 2020). Isso ocorre, pois, polímeros naturais são biocompatíveis com diversos sistemas biológicos em diferentes situações e são, em geral, biodegradáveis, características essenciais de um potencial biomaterial (Williams, 2022). Além disso, esse tipo de polímero é obtido a partir de recursos renováveis, tornando-os abundantes e de relativo baixo custo de produção e obtenção (George *et al.*, 2020b). Entre esse tipo de

polímero, uma classe de polímeros naturais é amplamente utilizada para o preparo de hidrogéis: os polissacarídeos (GEORGE et al., 2020b).

2.3. Polissacarídeos

Polissacarídeos englobam uma específica classe de polímeros naturais que existe em abundância na natureza (CHEN et al., 2020). Esse tipo de polímeros pode ser extraído de diferentes fontes vegetais e animais, sendo, portanto, renováveis (Maciel et al., 2019). Estruturalmente, polissacarídeos são constituídos por unidades monoméricas sacarídicas que são covalentemente ligadas entre si por ligações glicosídicas e possuem grande variabilidade estrutural e funcional. Essa grande diversidade estrutural advém de diferenças na estrutura das unidades monoméricas, da estereoquímica da ligação glicosídica, da extensão e grau de polimerização e presença (ou não) de ramificações (Mohammed; Naveed; Jost, 2021). De maneira geral, polissacarídeos são macromoléculas multifuncionais, já que sua estrutura pode apresentar diferentes grupos funcionais hidrofílicos, como, por exemplo, grupos hidroxila, amina, carboxila e sulfato (Mohammed; Naveed; Jost, 2021). De fato, polissacarídeos são polímeros com uma estrutura extremamente complexa e, em muitos casos, variável de acordo com sua fonte de extração e sazonalidade (Giljan et al., 2022). Ademais, esses polímeros têm complexos padrões de dobramento, incluindo estruturas lamelares, espirais e fibrosas, que surgem das interações entre as cadeias poliméricas (Mohammed; Naveed; Jost, 2021).

Todas essas particularidades estruturais culminam em polissacarídeos que possuem uma miríade de diferentes propriedades e aplicações. Na natureza, polissacarídeos executam vários papéis biológicos, incluindo como componentes de reforço estrutural, armazenamento de energia, comunicação e identificação celular e como transportadores de biomoléculas na circulação sanguínea (Giljan et al., 2022). Tendo em vista essas aplicações, não é surpresa que polissacarídeos sejam polímeros biodegradáveis e, em várias situações, biocompatíveis com tecidos humanos (Nichols et al., 2020). Essas características alavancam o uso de polissacarídeos no preparo de biomateriais, em especial de hidrogéis (Beaumont et al., 2021). Soma-se a isso a presença de

diversos grupos funcionais na estrutura dos polissacarídeos, os quais permitem o seu uso ou funcionalização visando a reticulação de suas cadeias e a obtenção de biomateriais (Fajardo *et al.*, 2012b). Considerando o preparo de biomateriais, os polissacarídeos celulose, pectina e quitosana são amplamente utilizados (Beaumont *et al.*, 2021). As principais características desses polissacarídeos serão sucintamente comentadas a seguir.

2.3.1. Celulose

A celulose (CL) é um dos polímeros naturais mais abundantes no planeta e esse polissacarídeo possui interessantes propriedades e aplicações em diversas áreas. Na natureza, a CL atua como principal componente estrutural da membrana das células vegetais e como reserva energética para processos vinculados à fotossíntese (Fu *et al.*, 2019). Em geral, a CL pode ser extraída da madeira, de fibras de algodão e a partir da atividade microbiana de certas espécies de bactéria (Gao; Liu; Edgar, 2018). Por conta da sua abundância, baixo-custo, biocompatibilidade e biodegradabilidade, a CL é amplamente utilizada no preparo de biomateriais poliméricos visando a liberação controlada de fármacos (especialmente no trato gastrointestinal), o revestimento de ferimentos e o cultivo de células (Jiang *et al.*, 2021). Entretanto, é preciso ressaltar que a celulose somente é biodegradável no ambiente e, em algumas situações, no meio trato gastrointestinal (por conta da ação bacteriana de certas bactérias) e, assim, a biocompatibilidade no interior dentro do corpo humano desse polissacarídeo é tema de debate por diversos pesquisadores (Jiang *et al.*, 2021). Em relação a sua estrutura química, a CL é um homopolissacarídeo linear consistindo em unidades monoméricas de *D*-glicopirranose com ligação glicosídica do tipo $\beta(1\rightarrow4)$, como mostrado na **Figura 2**. Em cada unidade monomérica da CL, existe três grupos hidroxila livres, incluindo um grupo primário na posição C-6 e outros dois grupos hidroxila secundários nas posições C-2 e C-3. Esses grupos hidroxila interagem fortemente por ligações de hidrogênio por conta da conformação espacial da cadeia polissacarídica da CL. Como consequência dessa conformação e interações de hidrogênio intercadeia, as cadeias polissacarídicas da CL são organizadas em estruturas semicristalinas laminares (Fu *et al.*, 2019).

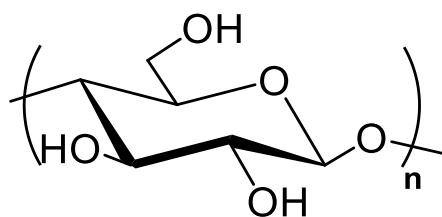


Figura 2. Estrutura química da unidade monomérica da celulose.

As fortes interações de hidrogênio entre os grupos hidroxila da CL, além de influenciar sua cristalinidade, impedem sua completa solubilização em água, já que tais grupos funcionais estão inacessíveis para interagir com as moléculas de água por solvatação (Fu *et al.*, 2019). Essa limitação impede o uso direto da CL para o preparo de diversos materiais. Essa desvantagem é facilmente contornada pela funcionalização da CL que resulta em derivados processáveis, solúveis em água e com grande versatilidade (GEORGE *et al.*, 2020). Nesse sentido, reações de eterificação e esterificação da CL são, provavelmente, as estratégias de funcionalização mais empregadas para introduzir as propriedades desejadas aos derivados da CL (Volokhova; Edgar; Matson, 2020). Por exemplo, diferentes tipos de éteres de celulose, como hidroxietil celulose e hidroxipropil celulose, ésteres de celulose, como acetato de celulose e succinato de celulose, e derivados carboximetilados da CL são empregados no preparo de biomateriais, desde micropartículas até hidrogéis (Fu *et al.*, 2019). Especialmente, hidrogéis de CL têm sido muito utilizados como sistemas de liberação controlada (Abbasian *et al.*, 2019), *scaffolds* (Jiang *et al.*, 2021) e curativos (Liu *et al.*, 2020b).

2.3.2. Pectina

A pectina (Pct) é um polissacarídeo solúvel em água que está presente em grande quantidade na parede celular de diferentes células vegetais. Portanto, esse polissacarídeo é extraído de fontes vegetais, incluindo resíduos vegetais, tais como: bagaço de frutas cítricas, cascas de beterraba e sementes de girassol (Li *et al.*, 2021). Esses resíduos são comumente tratados com ácidos inorgânicos

(HCl, H₂SO₄ ou HNO₃) por longos períodos e altas temperaturas para promover a hidrólise de lignina e hemiceluloses e facilitar a extração da Pct, a qual é obtida por filtração do meio e pela posterior adição de metanol ao filtrado (Lara-Espinoza *et al.*, 2018). Obviamente, dependendo das condições da reação de hidrólise ácida, Pct com diferentes graus de polimerização e peso molecular são obtidas (Lara-Espinoza *et al.*, 2018). Estruturalmente, a Pct é um dos polissacarídeos mais complexos existentes na natureza e sua estrutura química ainda não foi completamente elucidada (Cao, Jing *et al.*, 2020). De maneira geral, vários estudos apontam que a Pct possui um esqueleto linear composto de unidades monoméricas de ácido *D*-galacturônico unidas por ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$ (Cao, Lianqi *et al.*, 2020), cuja estrutura é mostrada na **Figura 3**. Eventualmente, *D*-xilose, *D*-galactose, *D*-glicose, *L*-arabinose, *L*-ramnose, ou uma combinação desses monossacarídeos neutros, são inseridos no esqueleto principal, gerando pontos de ramificação nas posições C-2 ou C-3 da unidade sacarídica principal (Li *et al.*, 2021). O componente principal da Pct é sua fração linear constituída por resíduos do ácido galacturônico. Logo, as propriedades desse polissacarídeo são determinadas por essa fração. Nesse sentido, uma grande porção dos grupos carboxílicos da fração linear da Pct estão esterificados com grupos metil, os quais são facilmente removidos por meio de um tratamento alcalino (Maciel *et al.*, 2019).

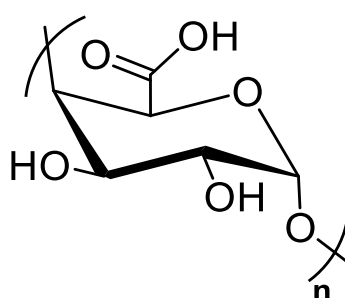


Figura 3. Estrutura química da parte linear da pectina (grau de desesterificacao de 100%).

A Pct é utilizada há bastante tempo como suplemento alimentar e como agente espessante em diferentes alimentos. Entretanto, o seu uso na fabricação de biomateriais é relativamente recente (Li *et al.*, 2021). Esse fenômeno está

relacionado com as recentes descobertas dos efeitos biológicos exercidos pela Pct como, por exemplo, sua capacidade de inibir a atividade de macrófagos e reduzir os efeitos inflamatórios (Li *et al.*, 2021), e sua atividade anticancerígena, a qual está relacionada com a adesão da Pct na proteína pro-metástase galectin-3, promovendo sua inibição (Wu, Dongmei *et al.*, 2020). Nessas aplicações, o grau de desesterificação é muito importante porque os grupos carboxílicos livres da Pct promovem um aumento na sua adesividade às células e membranas dos tecidos (Lara-Espinoza *et al.*, 2018). Portanto, o grau de desesterificação da Pct desempenha um importante papel na atividade biológica desse polissacarídeo (Lara-Espinoza *et al.*, 2018). Ainda, dependendo do grau de desesterificação, a Pct pode apresentar um caráter polianiônico (Li *et al.*, 2021). Em alinhamento com essas atividades biológicas, a grande biocompatibilidade e biodegradabilidade da Pct indicam a grande utilidade desse polissacarídeo no preparo de biomateriais que ativamente participam dos processos biológicos e não desempenham somente o papel de dispositivo de liberação controlada de um fármaco, por exemplo. De fato, hidrogéis de Pct são aplicados no tratamento de câncer (após remoção cirúrgica do tumor) (Li *et al.*, 2021), no cultivo celular (Lara-Espinoza *et al.*, 2018) e no tratamento de lesões (MORELLO *et al.*, 2023).

2.3.3. Quitosana

Outro polissacarídeo muito utilizado para o preparo de hidrogéis, visando sua aplicação como biomaterial, é a quitosana (QT), um copolímero linear cuja unidade monomérica é constituída de *D*-glicosamina e *N*-acetil-*D*-glicosamina conectadas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (Martins *et al.*, 2020), como demonstrado na **Figura 4**. A QT é um derivado obtido pela desacetilação da quitina, um polissacarídeo que é o principal componente das conchas dos crustáceos, do exoesqueleto dos insetos e da parede celular dos fungos (MACIEL *et al.*, 2019).Essencialmente, os parâmetros que afetam as características da QT são seu peso molecular e seu grau de desacetilação, os quais são determinados pelas condições experimentais selecionadas durante sua preparação, geralmente, baseada na hidrólise alcalina da quitina em altas temperaturas (Maciel *et al.*, 2019). Outra característica importante da QT é sua insolubilidade em água pura por causa das fortes interações de hidrogênio entre

os grupos funcionais presentes em sua estrutura monomérica (Caldas *et al.*, 2021). Tipicamente, a QT é solúvel em soluções aquosas ácidas com um pH menor que 6,0. Nessa condição, os grupos amina da QT são protonados ($-\text{NH}_3^+$) e a repulsão eletrostática entre as cadeias facilita sua solvatação e solubilização (CHEN *et al.*, 2020). Portanto, em um meio com pH relativamente ácido, os grupos amina da QT são carregados positivamente e tornam a QT em um polieletrólito catiônico (Maciel *et al.*, 2019). Em geral, quanto maior a quantidade desses grupos, maior a solubilidade da QT em água. Como consequência, a processabilidade desse polissacarídeo é beneficiada por um elevado grau de desacetilação (Caldas *et al.*, 2021).

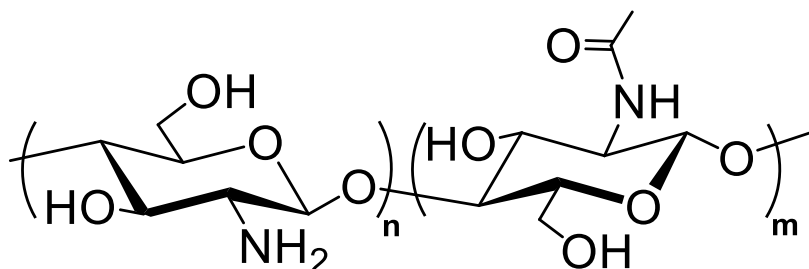


Figura 4. Estrutura química da unidade monomérica da quitosana ($n > m$).

Por conta de todas essas características, juntamente com sua grande biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade (mesmo *in vivo*), a QT tem sido utilizada no preparo de vários biomateriais (Rajabi *et al.*, 2021). Não obstante, esse polissacarídeo possui propriedades bioativas únicas. Por exemplo, diversas pesquisas relatam a atuação da QT na cicatrização de ferimentos ao possuir ação antitumoral e propriedades anticoagulantes, as quais permitem a aplicação desse polissacarídeo no desenvolvimento de dispositivos de liberação de fármacos e de substratos porosos (Rajabi *et al.*, 2021). Aliás, duas propriedades da QT que impactam o seu uso no preparo de biomateriais são sua natureza catiônica e a alta densidade de cargas em solução ácida. Em conjunto, essas características permitem a fabricação de complexos iônicos insolúveis com espécies polianiónicas em água. Isso resulta no uso dos complexos polieletrólíticos de QT para diferentes aplicações biomédicas (Rajabi *et al.*, 2021). De maneira geral, hidrogéis de QT são empregados na liberação

controlada de fármacos (MORELLO *et al.*, 2023), no revestimento de ferimentos (Fajardo *et al.*, 2012b) e como *scaffolds* para cultivo celular (CHEN *et al.*, 2020).

Capítulo 3 – Hidrogel de quitosana preparado por meio de uma nova estratégia de reticulação catalisada por ácido bórico: Desenvolvimento, síntese e caracterização

3.1. Introdução

Hidrogéis quimicamente reticulados baseados em polissacarídeos são muito utilizados em aplicações biomédicas que requerem biomateriais com elevada estabilidade e robustez mecânica, como é o caso de curativos ou *scaffolds* (Hu *et al.*, 2019a). Considerando esse tipo de aplicação, estudos na literatura relatam os benefícios associados com as reações de adição de Michael para a síntese de hidrogéis (He, Jiahui *et al.*, 2020). Esse tipo de reação ocorre entre um nucleófilo (doador de Michael) e um alceno eletrofílico (aceptor de Michael), em condições experimentais brandas, possuindo grande seletividade e eficiência (He, Jiahui *et al.*, 2020). Esse tipo de reação envolve polímeros contendo grupos tióis (doador de Michael) e polímeros possuindo um grupo carboxílico α,β insaturado (aceptor de Michael) que reagem em condições básicas. Entretanto, alguns riscos relacionados com reações paralelas na adição de tio-Michael (por exemplo, a formação de ligações dissulfeto) e a oxidação dos grupos tióis prejudicam a sua eficiência (Smith *et al.*, 2018). Uma alternativa para contornar essas desvantagens é o uso de grupos amina como doadores de Michael que, surpreendentemente, é pouco explorado para promover a reticulação de polímeros para a fabricação de hidrogéis, provavelmente por conta do baixo caráter nucleofílico dos grupos amina em comparação com outros doadores de Michael, como os grupos tiol. É importante mencionar que quando grupos amina são empregados como doadores de Michael a reação é denominado de reação de adição de aza-Michael (Gholamali, 2019).

Neste Capítulo, uma nova estratégia para o preparo de um hidrogel quimicamente reticulado baseada em uma reação de adição de aza-Michael é apresentada. Para o preparo desse hidrogel, QT, um polissacarídeo que possui em sua estrutura diversos grupos amina (doadores de Michael), e um polímero contendo grupos carboxílicos α,β insaturados (aceptores de Michael) foram utilizados. Hidrogéis de QT são frágeis e possuem uma baixa resistência ao

impacto. Logo, a sua aplicação como biomaterial é restrita (de Souza; da Silva; Fajardo, 2017a). Portanto, poli(vinil álcool) (PVA), um polímero sintético solúvel em água que possui excelentes propriedades mecânicas foi funcionalizado com grupos α,β insaturados e utilizado com a QT para o preparo do hidrogel baseada na reticulação química por meio da reação de adição aza-Michael.

Como mencionado anteriormente, grupos amina possuem um baixo caráter nucleofílico e, como consequência, a sua reatividade como doador de Michael é reduzida. Nesse estudo, ácido bórico (H_3BO_3) foi utilizado como catalisador da reação de aza-Michael entre a QT e o PVA funcionalizado objetivando a reticulação desses polímeros e o preparo do hidrogel. Nos últimos anos, vários estudos relatam o uso do H_3BO_3 como catalisador em reações de síntese orgânica, incluindo reações de adição de aza-Michael, devido ao seu caráter ácido de Lewis (Ren *et al.*, 2015). Desse modo, o H_3BO_3 foi utilizado como catalisador da reação. Além de investigar a viabilidade dessa estratégia no preparo do hidrogel, o efeito de vários parâmetros experimentais (razão entre as massas de QT:PVA, pH e concentração de ácido bórico) na eficiência da reticulação foi investigado. Ainda, uma série de técnicas espectroscópicas (FTIR e RMN de 1H e ^{13}C) foram utilizadas para clarificar o mecanismo de reticulação. Ainda, as propriedades térmicas, mecânicas, morfológicas e de intumescimento do hidrogel preparado também foram investigadas.

3.2. Experimental

3.2.1. Materiais

Quitosana (QT, 85% desacetilada, M_v 87.000 g mol⁻¹) foi adquirida da Golden-Shell Co. (China). O grau de desacetilação da QT foi aumentado de acordo com a metodologia previamente descrita por QUADRADO *et al.* (2021), onde todas as análises de caracterização podem ser encontradas. O grau de desacetilação final da QT obtida foi estimado em 98%. Poli(vinil álcool) (PVA, 98% hidrolisado, M_w 124.000 g mol⁻¹), metacrilato de glicidila (GMA) e curcumina (Cur) da *Curcuma longa* foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Ácido acético, etanol e ácido bórico (H₃BO₃) foram adquiridos da Synth (Brasil). Com exceção da QT, todos os outros reagentes são de grau analítico.

3.2.2. Funcionalização química do PVA utilizando GMA

A estratégia para a funcionalização química do PVA com GMA foi adaptada da literatura (Reis *et al.*, 2009). Um esquema geral do protocolo experimental adotado é mostrado na **Figura 5**. O PVA funcionalizado com GMA (denominado de PVA-MA) foi sintetizado a partir da solubilização do PVA (1,5 g) em água destilada (150 mL) a 80 °C por 2 h. Posteriormente, o pH da solução foi ajustado para pH 3,5 com uma solução aquosa de HCl (1 mol L⁻¹). Em seguida, GMA (0,98 mL) foi adicionado ao sistema reacional, sendo o mesmo aquecido a 60 °C. De acordo com REIS *et al.* (2009), no pH próximo de 3,5, a introdução do GMA na estrutura do PVA ocorre pela abertura do anel do grupo epóxido do GMA e não pela reação de transesterificação, a qual é reversível. Por esse motivo, nesse estudo, o pH 3,5 foi selecionado. Assim, a reação foi mantida sob agitação magnética constante por 48 h. Após esse intervalo de tempo, o sistema foi resfriado e o PVA-MA foi precipitado com a adição de etanol (100 mL) e, então, recuperado por filtração à vácuo. O produto foi lavado várias vezes com etanol para remover qualquer material que não reagiu. O PVA-MA foi congelado e liofilizado a -55 °C por 24 h.

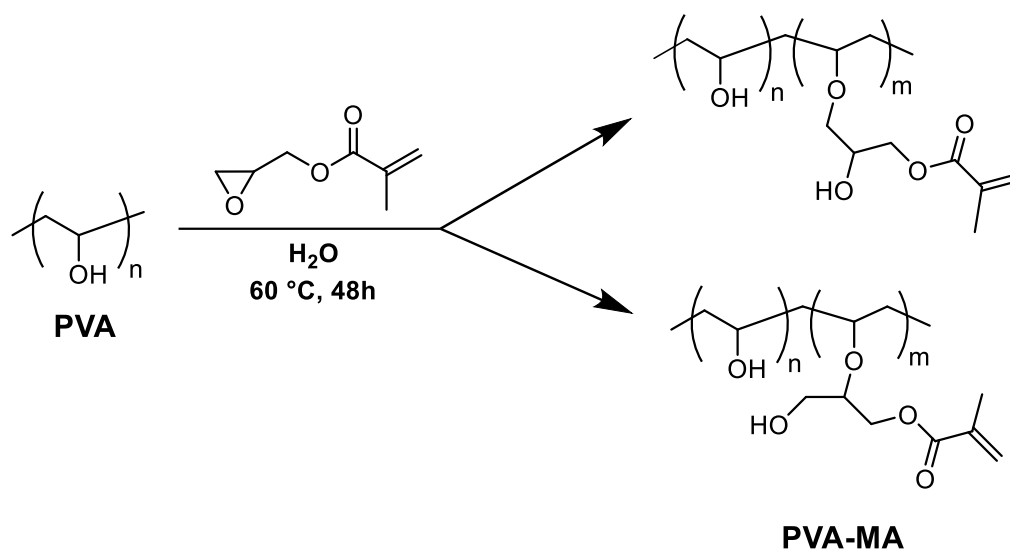


Figura 5. Esquema ilustrativo da reação de funcionalização do PVA com grupos metacrilatos e a obtenção do PVA-MA.

A funcionalização do PVA com GMA foi confirmada por FTIR e RMN de ^1H e ^{13}C . **Rendimento:** 1,10 g (73,34 %). FTIR (cm^{-1}): 3450 (O–H); 2980–2830 (C–H); 1680 ($\text{C}=\text{O}_{\text{GMA}}$); 1640 ($\text{C}=\text{C}$). **RMN de ^1H (400 MHz, D_2O , δ , ppm):** 6,17 ($\text{C}=\text{CH}_2$, próton vinílico,); 5,74 ($\text{C}=\text{CH}_2$, próton vinílico); 4,18 (CH_{PVA} , próton metilênico); 3,80–3,54 (CH , prótons da estrutura carbônica do GMA); 1,93 (CH_3 , próton metílico). **RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O , δ , ppm):** 168,00 ($\text{C}=\text{O}_{\text{GMA}}$); 138,40 ($\text{C}=\text{CH}$); 130,00 ($\text{C}=\text{CH}$); 75–65 (CH_{GMA}); 43,90 (CH_{PVA}). Utilizando o espectro de RMN de ^1H (Zhang, Junmei *et al.*, 2019), o grau de substituição do PVA-MA foi estimado como 0,51.

3.2.3. Preparo do hidrogel

Hidrogéis de QT e PVA-MA foram preparados por meio de uma reação de adição aza-Michael utilizando ácido bórico como catalisador. Para avaliar a viabilidade e robustez desse método, alguns parâmetros relacionados ao preparo dos hidrogéis foram otimizados conforme destacado na **Figura 6**. Resumidamente, a razão entre as massas de QT:PVA-MA (1:1, 1:2 e 1:3), concentração de catalisador (0,1; 0,5 e 1,0 mmol L^{-1}) e o pH do meio reacional (2, 4 e 6) foram variados e seu efeito na síntese do hidrogel foi investigado (Xiong

et al., 2020). De maneira geral, para o preparo dos hidrogéis, QT (0,05 g) foi solubilizada em uma solução aquosa de ácido acético (0,05% v/v, 5 mL) sob agitação constante a temperatura ambiente. Separadamente, PVA-MA (0,05; 0,10 ou 0,15 g) foi solubilizado em água destilada (5 mL) a 80 °C por 12 h. Posteriormente, a solução de PVA-MA foi resfriada até a temperatura ambiente e, então, adicionada na solução de QT. A solução resultante foi homogeneizada (10 min sob agitação constante) e H₃BO₃ foi adicionado, seguido pelo ajuste do pH da solução pela adição de soluções aquosas de HCl (1 mol L⁻¹) ou NaOH (1 mol L⁻¹). Após esse passo, a temperatura foi aumentada para 60 °C (essa temperatura foi selecionada a partir de experimentos realizados previamente).

A obtenção do hidrogel, como também, o tempo de gelificação foram determinados pela simples inversão do frasco (Ye *et al.*, 2016). O tempo de gelificação foi definido como o tempo necessário para a solução se solidificar e não escoar quando o frasco é invertido (Ye *et al.*, 2016). Os hidrogéis obtidos foram recuperados e purificados em água pura acidificada (100 mL, pH ~ 5) por 24 h para remover o H₃BO₃ e polímeros não reticulados. A água utilizada para a purificação dos hidrogéis sintetizados foi filtrada e, então, utilizada para a quantificação do ácido bórico solúvel através de um método colorimétrico utilizando curcumina (Cur) (Pan *et al.*, 2020). Os hidrogéis purificados foram secos por liofilização (-55 °C, 48 h). O rendimento do gel foi usado como um parâmetro quantitativo para demonstrar a eficiência da gelificação do processo de reticulação (Zhang, Junmei Zhi Junji *et al.*, 2019). O rendimento do gel foi estimado por meio da Eq. (1) (Brar; Kaur, 2018):

$$Rendimento (\%) = \frac{H_m}{M_m} \times 100 \quad (1)$$

onde H_m é a massa (em g) do hidrogel purificado seco e M_m é a massa (em g) é a massa total dos polímeros utilizados para preparar o hidrogel. O rendimento médio foi estimado dos experimentos feitos em triplicata.

3.2.4. Técnicas de caracterização

Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) foi realizada em um espectrômetro Shimadzu (modelo 300, Japão) operando na faixa espectral de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . Espectroscopia de ressonância magnética (RMN) de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) foram realizadas em um espectrômetro Bruker (modelo Avance DPX 400, Austrália) operando a 400 e 100 MHz para ^1H e ^{13}C . Os espectros foram obtidos em água deuterada e DSS foi utilizado como padrão interno. Para essas análises, uma amostra dos hidrogéis foi moída e, então, solubilizada no solvente deuterado. A fração solúvel foi analisada no espectrômetro. Todas as análises reológicas foram conduzidas em um reômetro HAAK RS 150 (Thermo Fisher, EUA) com geometria de placas paralelas (35 mm de diâmetro e *gap* de 2 mm). A amostra (6 mL) em diferentes tempos reacionais foi alocada entre as placas, sendo submetida a um estresse de 0,1 Pa, no intervalo de frequência de 1 até 10 Hz. Durante essas análises, os módulos elásticos (G') e viscoso (G'') foram computados e $\tan \delta$ foi calculada como a razão entre os módulos (G''/G'). Essas análises foram realizadas em triplicata. A morfologia do hidrogel foi investigada em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) JEOL JSM-6610LV (EUA). Para isso, a amostra do hidrogel foi recoberta com uma fina camada de ouro e examinadas no microscópio. Os ensaios de compressão mecânica foram realizados em um texturômetro TA.TX2 Stable Microsystems (Reino Unido). Nesses ensaios, amostras intumescidas do hidrogel (20 x 20 x 20 mm) foram analisadas na temperatura de 25 °C em um ambiente com umidade controlada (50%). Esses ensaios foram realizados em triplicata. Para os experimentos de intumescimento máximo, amostras secas do hidrogel (100 mg) foram imersas e incubadas em meio PBS (pH 7,4) na temperatura de 37 °C. Após 24 h, as amostras foram retiradas, o excesso de líquido na superfície da amostra foi absorvido com um papel absorvente e a amostra foi pesada novamente. O grau de intumescimento máximo foi estimado pela Eq. (2). Para verificar a estabilidade do hidrogel, a perda de massa desse material foi investigada utilizando um método similar ao descrito acima. Para isso, amostras do hidrogel foram incubadas em PBS (pH 7,4) na temperatura de 37 °C. Em determinados intervalos de tempo, as amostras foram retiradas, secas em estufa (50 °C por 24

h) e pesadas novamente. Após a pesagem, essas amostras foram incubadas novamente no mesmo meio. A perda de massa das amostras do hidrogel preparado foram calculadas pela Eq. (3). Todos esses experimentos foram realizados em triplicata.

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{w_{it} - w_0}{w_0} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{w_{st} - w_0}{w_0} \times 100\% \quad (3)$$

onde w_{it} e w_{st} são, respectivamente, a massa intumescida e seca da amostra em um determinado tempo t , enquanto w_0 é a massa inicial da amostra.

A densidade de reticulação (v_e) dos hidrogéis preparados foi estimada por um método baseado no intumescimento máximo desses materiais, onde a Equação de Flory-Rehner foi empregada (Khan *et al.*, 2017). Para esses experimentos, amostras secas (100 mg) dos hidrogéis foram imersas em água durante um intervalo de 24 h. Após esse período, o excesso de líquido foi removido da amostra com um papel absorvente e a amostra foi pesada novamente. O peso intumescido da amostra foi utilizado para estimar v_e (em mol m^{-3}), o qual foi calculado por meio das Eqs. (4)–(7):

$$M_C = - \frac{d_H V_S \left(\sqrt[3]{V_P} - \frac{V_P}{2} \right)}{\ln(1 - V_P) + V_P + \chi(V_P^2)} \quad (4)$$

$$V_P = \left[1 + \frac{d_H}{d_S} \left(\frac{w_{it}}{w_{st}} - 1 \right) \right]^{-1} \quad (5)$$

$$\chi = \frac{\ln(1 - V_P) + V_P}{V_P^2} \quad (6)$$

$$v_e = \frac{d_H}{M_C} \quad (7)$$

onde M_C é o peso molecular médio entre os pontos de reticulação, w_{it} e w_{st} são as massas (em g) do hidrogel no estado intumescido e seco, respectivamente. V_S é volume molar médio do solvente ($18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$), V_P é a fração volumétrica da rede polimérica no estado intumescido, d_S é a densidade do solvente (em g cm^{-3}), χ é o parâmetro de interação polímero-solvente e d_H é a densidade do hidrogel (estimada com um picnômetro) (Khan *et al.*, 2017). Os experimentos foram realizados na temperatura de 25°C .

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Síntese do hidrogel QT/PVA-MA

De maneira geral, o processo de reticulação dos polímeros QT e PVA-MA foi baseado na reação de adição de aza-Michael. Nesse tipo de reação, a reatividade dos doadores de Michael é fundamental para atingir uma grande eficiência; no caso da QT, dos grupos amina. Porém, como mencionado anteriormente, a reatividade desses grupos funcionais é limitada e a eficiência da reação de aza-Michael para a formação de hidrogéis constituídos pela QT é pequena. Para contornar essa limitação, H_3BO_3 foi utilizado como catalisador para mediar a reação de aza-Michael entre a QT e o PVA-MA. Recentemente, H_3BO_3 tem sido empregado como catalisador de várias reações orgânicas sintéticas ou, até mesmo, reações de polimerização devido ao seu caráter ácido de Lewis (Hall, 2019). Logo, o H_3BO_3 é capaz de formar complexos estáveis com grupos funcionais ricos em elétrons e acelerar reações de adição (Hall, 2019). Portanto, ele foi utilizado como catalisador para o preparo do hidrogel de QT e PVA-MA.

Um esquema ilustrativo geral da formação do hidrogel é apresentado na **Figura 6**. O PVA-MA possui uma porção metacrilatada em sua estrutura contendo grupos carbonila ($-\text{C}=\text{O}$) e vinil ($-\text{C}=\text{CH}_2$). Considerando os aspectos acima discutidos, a hipótese apresentada aqui é que o H_3BO_3 interage com os grupos carbonila, que são ricos em elétrons, favorecendo o ataque nucleofílico dos grupos amina da QT nos grupos insaturados do PVA-MA e, conseqüentemente, formando o hidrogel. Para validar essa hipótese, uma série de experimentos variando a massa entre QT/PVA-MA, pH do meio reacional e

concentração de H_3BO_3 foram realizados. O efeito desses parâmetros no rendimento e no tempo de gelificação está sumarizado na **Tabela 1**.

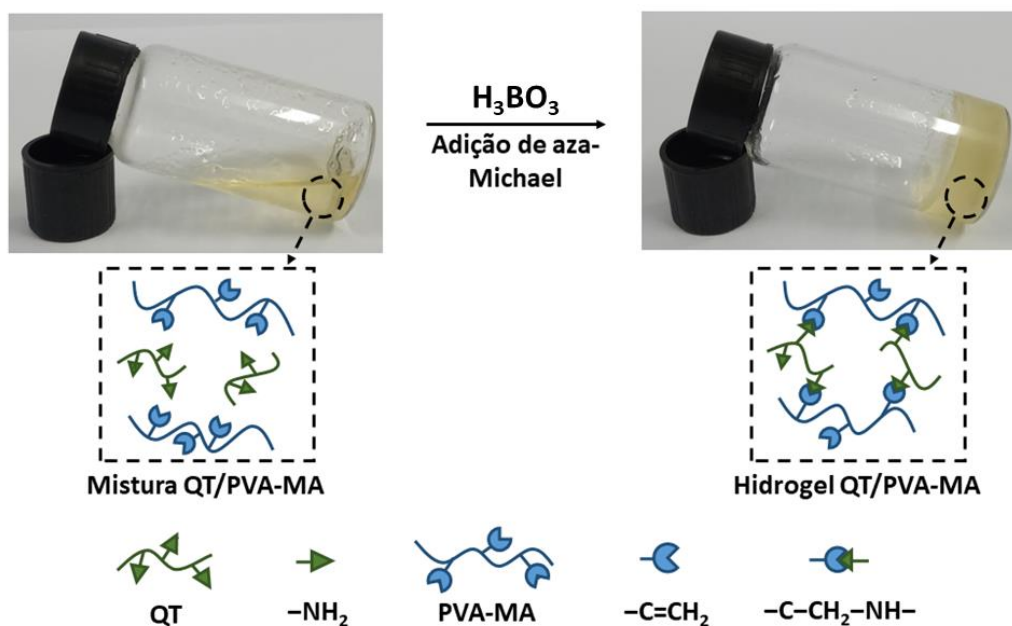


Figura 6. Esquema ilustrativo para a síntese do hidrogel QT/PVA-MA usando H_3BO_3 como catalisador.

Tabela 1. Tempo de gelificação e rendimento para a síntese do hidrogel em diferentes condições.

Entrada	Razão QT/PVA-MA (m/m)	pH	Concentração de H_3BO_3 (mmol L^{-1})	Tempo de gelificação (horas)	Rendimento (%) ^a	ν_e (mol m^{-3}) ^a
1	1:0	4,0	1,0	-	-	-
2	0:1	4,0	1,0	-	-	-
3	1:1	4,0	1,0	24	29,02 ± 2,10	20,0 ± 4,1
4	1:2	4,0	1,0	48	91,00 ± 3,00	30,0 ± 1,1
5	1:3	4,0	1,0	72	60,00 ± 6,91	24,5 ± 0,2
6	1:2	2,0	1,0	-	-	-
7	1:2	6,0	1,0	48	20,00 ± 5,00	15,1 ± 1,5
8	1:2	4,0	0,1	96	53,00 ± 8,71	14,0 ± 0,4
9	1:2	4,0	0,5	48	70,00 ± 1,00	26,0 ± 2,4
10	1:2	4,0	Sem catalisador	-	-	-

^aExperimentos realizados em triplicata.

Como demonstrado na **Tabela 1**, a presença de QT, PVA-MA e H_3BO_3 é necessária para a formação do hidrogel (**Tabela 1**, entradas 1, 2 e 10). Além disso, as suas quantidades possuem um grande efeito no processo de gelificação e solidificação da solução formadora do hidrogel. Por exemplo, a variação da razão entre as massas de QT e PVA-MA afetou drasticamente o rendimento da síntese, como também, o tempo de gelificação (**Tabela 1**, entradas 3, 4 e 5). É importante mencionar que, para esses experimentos, a quantidade de QT foi mantida constante. De maneira geral, quando a mesma massa de QT e PVA-MA foi utilizada, o hidrogel foi obtido, porém, com um baixo rendimento (**Tabela 1**, entrada 3). Contudo, o rendimento do processo de síntese aumentou quando a razão entre as massas dos polímeros foi aumentada. Curiosamente, a maior razão de massa entre QT e PVA-MA resultou em um baixo rendimento na síntese do hidrogel (**Tabela 1**, entrada 5) quando comparada com a razão de massa intermediária (**Tabela 1**, entrada 4), onde o hidrogel foi sintetizado mais rapidamente e com um alto rendimento. Esses resultados indicam que o processo de gelificação é dependente da quantidade total dos grupos amina e vinil da QT e PVA-MA. A quantidade desses grupos está diretamente relacionada às massas dos polímeros utilizados na síntese do hidrogel. Na menor razão entre as massas de QT e PVA-MA existe uma baixa quantidade de grupos vinil acessíveis para reagir com os grupos amina e, como resultado, o processo de gelificação é pouco eficiente e resulta na formação de uma rede polimérica frágil. Por outro lado, na maior razão entre as massas dos polímeros, há um excesso de grupos vinílicos, mas uma quantidade limitada de grupos amina capazes de reagir (Ye *et al.*, 2016). Logo, apesar da rede polimérica ser formada, o processo de síntese é ineficiente. Considerando esses resultados, a razão intermediária entre as massas de QT e PVA-MA (razão entre as massas de 1:2) foi selecionada como condição ótima para a síntese do hidrogel QT/PVA-MA.

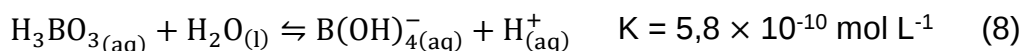
Como verificado na **Tabela 1**, outro fator que afeta a formação do hidrogel é o pH do meio reacional. Em geral, esse efeito é esperado, pois, o pH influencia drasticamente a reatividade dos grupos amina como doadores de Michael na reação de adição de aza-Michael (Kamoun *et al.*, 2015). Resumidamente, a QT é solúvel em água somente na presença de ácidos que

promovem a protonação dos grupos amina e facilitam a absorção de água e solubilização desse polissacarídeo (Kamoun *et al.*, 2015). Entretanto, a protonação dos grupos amina diminui a sua reatividade como nucleófilo, assim, *a priori*, prejudicando a eficiência da reação de aza-Michael. Apesar disso, a protonação desses grupos funcionais da QT é vital para formar uma solução homogênea e prevenir a síntese de um hidrogel heterogêneo. Portanto, um balanço entre os grupos amina protonados e não-protonados é muito importante para a estratégia de reticulação química proposta neste estudo. Nesse sentido, o equilíbrio entre os grupos amina protonados e não-protonados também influencia no balanço dessas espécies.

A **Tabela 1** mostra que a melhor condição de pH do meio reacional foi em torno do pH 4, onde um grande rendimento da síntese do hidrogel foi obtido (**Tabela 1**, entrada 4). Em torno do pH 2, o hidrogel não foi formado (**Tabela 1**, entrada 6), provavelmente por conta da protonação da maioria dos grupos amina da QT nessa condição de pH. Isso reduz a reatividade da QT na reação de aza-Michael e a eficiência do processo de reticulação (Blackburn, 2004). Quando a reação de reticulação foi realizada em, aproximadamente, pH 6, a solução dos polímeros foi solidificada, porém, o rendimento da síntese do hidrogel foi baixo (**Tabela 1**, entrada 6). O subsequente aumento do pH do meio reacional de, aproximadamente, pH 8 até pH 10 não resultou na formação do hidrogel (esses resultados não foram mostrados na **Tabela 1**). De modo geral, à medida que o pH do meio de reação aumenta, os grupos amina da QT são desprotonados e esse polissacarídeo começa a precipitar. Por consequência, os grupos aminas não são capazes de reagir com os grupos vinílicos do PVA-MA e o hidrogel não pode ser formado. A partir dos resultados apresentados na **Tabela 1**, aparentemente, em pH 4 há um balanço favorável entre os grupos amina protonados e desprotonados na estrutura da QT que permite a reticulação com o PVA-MA. Ainda, considerando o equilíbrio químico entre essas espécies químicas, o consumo dos grupos amina não-ionizados (não-protonados) desloca o equilíbrio a favor dessas espécies, logo, favorecendo a reação de aza-Michael. Outro efeito que pode explicar a baixa eficiência do processo de gelificação quando o pH do meio reacional aumenta ($\text{pH} \geq 6$) é a complexação do ácido bórico (ou outra espécie derivada) com os grupos hidroxila do PVA-MA ou até

mesmo da QT (Geng; Haque; Oksman, 2016b). Como consequência, a disponibilidade do catalisador é reduzida e a reticulação dos polímeros é prejudicada. Aparentemente, nessas condições experimentais ($\text{pH} \geq 6$), a precipitação da QT possui um maior efeito na reticulação e síntese do hidrogel (Geng; Haque; Oksman, 2016b). Por conta disso, nesse estudo, a melhor condição de pH para a síntese do hidrogel QT/PVA-MA foi em torno do pH 4. Todos os experimentos posteriores foram realizados nesse pH.

Finalmente, o efeito da concentração de H_3BO_3 na formação do hidrogel também foi investigado (**Tabela 1**). De modo geral, o aumento da concentração do catalisador de 0,1 para 1 mmol L^{-1} (**Tabela 1**, entradas 4, 8 e 9) resultou em um processo de gelificação mais eficiente (maior rendimento na síntese do hidrogel em um menor tempo de gelificação). Esses resultados indicam que uma maior quantidade de H_3BO_3 facilita o ataque nucleofílico dos grupos amina da QT nos grupos vinílicos do PVA-MA. Tendo em vista todos os resultados experimentais obtidos, as condições reacionais descritas na entrada 4 da **Tabela 1** foram selecionadas como ótimas para a síntese do hidrogel. Outro aspecto que deve ser mencionado é que derivados de ácidos borônicos, incluindo o H_3BO_3 , podem atuar como agentes de reticulação da QT e PVA-MA por conta da complexação desses compostos com os grupos hidroxila ($-\text{OH}$) desses polímeros, como mencionado anteriormente. Porém, a formação desses complexos somente é favorável em meio alcalino ($\text{pH} > 6$) e em grandes concentrações dos compostos borônicos ($> 1 \text{ mmol L}^{-1}$) (Geng; Haque; Oksman, 2016a). Realmente, segundo vários estudos na literatura, o parâmetro mais importante para a reticulação utilizando H_3BO_3 é o pH do meio, já que o H_3BO_3 é uma ácido de Lewis fraco (Geng *et al.*, 2017). Na água, o H_3BO_3 forma os íons tetraborato, como demonstrado na Eq. (8). Esses íons são responsáveis pela reticulação de polímeros contendo grupos hidroxila por meio de ligações de hidrogênio ou ligações B–O. A partir da Eq. (8) é possível constatar que o aumento do pH ($\text{pH} \geq 6$) favorece a formação dos íons tetraborato, onde íons OH^- são os ligantes do boro. Todavia, em condições ácidas de pH, o equilíbrio é deslocado à esquerda da reação e a forma não-ionizada do H_3BO_3 é favorecida, sendo dominante nessa condição de pH (Geng *et al.*, 2017).



$$\text{pK}_a = 6.00 - 9.23$$

Dessa forma, de acordo com as ótimas condições experimentais (pH em torno de 4 e concentração de H_3BO_3 de 1 mmol L^{-1}) selecionadas para a síntese do hidrogel QT/PVA-MA, a reticulação por H_3BO_3 , apesar de possível, é insignificante. Ainda, a quantidade de H_3BO_3 presente no hidrogel preparado nas condições ótimas é muito pequena (aproximadamente, 0,4 % m/m) após o processo de purificação e não é capaz de promover a reticulação dos polímeros e formar um hidrogel estável, como mostra a **Figura 7**. Em resumo, todos os resultados obtidos indicam que a reticulação entre a QT e o PVA-MA ocorreu por meio de uma reação de adição de aza-Michael catalisada pelo H_3BO_3 .



Figura 7. Solução polimérica contendo 0,4 % m/m de H_3BO_3 .

Tipicamente, a cinética de gelificação de soluções poliméricas e a transição sol-gel são investigadas por meio de análises reológicas dinâmicas. Nessas análises, uma alíquota da solução polimérica é submetida a uma tensão (ou deformação) de cisalhamento constante, em uma determinada frequência, e os valores de G' e G'' são computados em função do tempo. A transição sol-gel é caracterizada pela intersecção das curvas G' e G'' , onde o “ponto de gelificação” e t_{gel} são definidos quando os valores dos módulos são iguais (Sun Han Chang *et al.*, 2019b). Ainda, a razão entre os módulos G'' e G' é representada pela tangente de perda ($\tan \delta = G''/G'$), que pode ser interpretada como a razão entre o comportamento viscoso e elástico da amostra. No ponto de gelificação, o valor de $\tan \delta$ é aproximadamente 1 ($G''/G' = 1$) (SUN HAN

CHANG et al., 2019). Logo, a transição sol-gel também pode ser investigada por meio da análise dos valores de $\tan \delta$ em função do tempo. Em geral, após a gelificação, $\tan \delta$ diminui ($\tan \delta < 1$) devido ao aumento do caráter elástico da amostra (SUN HAN CHANG et al., 2019). Nesse sentido, o longo tempo necessário para a gelificação da solução QT/PVA-MA impossibilitou a análise contínua em função do tempo dos valores de G' e G'' das soluções preparadas de acordo com as condições mostradas na **Tabela 1**. Portanto, uma alíquota de cada meio reacional preparado de acordo com a **Tabela 1** foi submetido a análises reológicas dinâmicas em diferentes intervalos de tempo (6, 12, 24, 48, 60, 72, 84, 96 e 110h), variando-se a frequência (1–10 Hz). A partir das curvas G' e G'' obtidas, os valores de $\tan \delta$ (G''/G') foram determinados para cada tempo reacional analisado. Para essas análises, somente os valores de G' e G'' obtidos na frequência de 1 Hz foram utilizados para calcular $\tan \delta$. Não obstante, as soluções preparadas nas condições experimentais das entradas 1, 2, 6 e 10 da **Tabela 1** não foram analisadas, já que, nessas condições, a gelificação não ocorreu. As curvas G' e G'' originais podem ser encontradas no **Apêndice A**. Os valores de $\tan \delta$ em função do tempo para as soluções que gelificaram são mostrados na **Figura 8**.

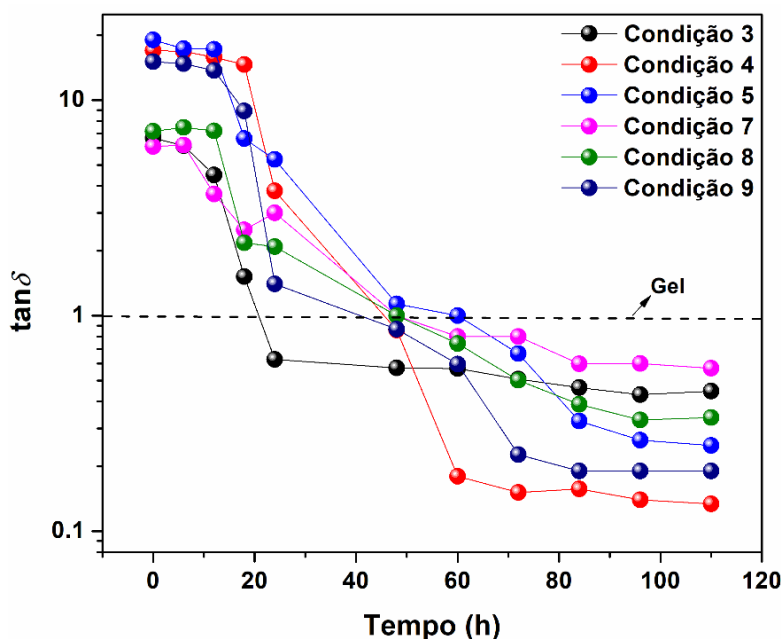


Figura 8. Valores de $\tan \delta$ para as soluções preparada em cada condição reportada na respectiva entrada na **Tabela 1**. Os valores do desvio padrão não foram mostrados para facilitar a visualização.

Como é possível verificar na **Figura 8**, na presença de QT, PVA-MA e H_3BO_3 , todas as soluções gelificam após a mistura desses componentes ($\tan \delta \leq 1$). De forma geral, o processo de gelificação das soluções possui um período de indução, onde $\tan \delta$ apresenta uma pequena variação devido ao lento processo de difusão e reorganização das cadeias dos polímeros durante a reação de reticulação (SUN HAN CHANG et al., 2019). Eventualmente, $\tan \delta$ atinge o valor unitário de 1, indicando a gelificação e a transição sol-gel, onde os módulos G' e G'' possuem o mesmo valor. Após o ponto de gelificação, o valor de $\tan \delta$ diminui progressivamente devido a formação de uma rede polimérica estável e o aumento do caráter elástico da amostra ($G' > G''$; $\tan \delta \leq 1$). Os tempos de gelificação t_{gel} estimados pelas análises reológicas são semelhantes aos obtidos pelos testes de inversão do frasco (**Tabela 1**). Ainda, os valores de densidade de reticulação (ν_e) dos hidrogéis sintetizados foram estimados por um método que utiliza a capacidade de intumescimento máximo desses materiais. De acordo com os resultados obtidos, o hidrogel preparado nas condições da entrada 4 na **Tabela 1** apresenta o maior valor de ν_e , indicando uma grande densidade de reticulação e uma rede polimérica formada por diversos pontos de reticulação devido a reação de aza-Michael entre QT e PVA-MA. Portanto, as condições experimentais descritas na entrada 4 da **Tabela 1** acarretam um processo de gelificação mais eficiente e rápido.

É importante mencionar que não foi possível excluir a influência do H_3BO_3 das análises reológicas do processo de gelificação das soluções QT e PVA-MA. Como mencionado, o ácido bórico pode formar fortes ligações de hidrogênio com os grupos funcionais da QT e PVA-MA. Apesar disso, nas condições experimentais testadas, tal interação é insignificante e não é responsável pelo processo de gelificação das soluções de QT e PVA-MA.

3.3.1.1. Investigação do mecanismo de gelificação

A partir dos resultados descritos e discutidos acima é possível constatar a viabilidade da estratégia de reticulação entre a QT e o PVA-MA proposta neste estudo. Em seguida, com o intuito de investigar o mecanismo de reticulação e

gelificação, a estrutura química do hidrogel obtido (preparado nas condições experimentais ótimas descritas na entrada 4 da **Tabela 1**) foi examinada por FTIR e RMN de ^1H e ^{13}C (**Figura 9**). A **Figura 9a** mostra os espectros de FTIR da QT, PVA-MA e do hidrogel QT/PVA-MA. No espectro da QT é possível verificar as bandas características desse polissacarídeo, como, por exemplo, uma banda larga centrada em 3470 cm^{-1} (sobreposição do estiramento das ligações N–H e O–H dos grupos amina e hidroxila, respectivamente), outra banda larga do tipo ombro em 1625 cm^{-1} (deformação da ligação N–H) e, por fim, uma banda fina em 1410 cm^{-1} (estiramento da ligação C–N) (de Souza; Silva; Fajardo, 2017a). O espectro de FTIR do PVA-MA exibiu suas bandas características em 3460 cm^{-1} (estiramento da ligação O–H dos grupos hidroxila), em 1680 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} (estiramento das ligações C=O e C=C da porção metacrilatada) (Zhang, Junmei *et al.*, 2019). Já o espectro do hidrogel apresentou as bandas características advindas da QT e do PVA-MA com algumas mudanças. Por exemplo, a banda associada aos grupos vinílicos do PVA-MA (em 1640 cm^{-1}) desapareceu no espectro do hidrogel. Ainda, a banda associada à sobreposição entre os estiramentos O–H e N–H da QT ficou mais fina e foi deslocada para um menor número de onda (de 3470 cm^{-1} para 3415 cm^{-1}). As bandas relacionadas à deformação e estiramento das ligações N–H e C–N, respectivamente, ficaram mais largas e foram deslocadas para um número de onda maior (1615 cm^{-1} e 1420 cm^{-1}). Todas essas mudanças no espectro de FTIR do hidrogel em comparação com os espectros da QT e do PVA-MA indicam a alteração no ambiente químico desses grupos funcionais, provavelmente, devido a reação de adição de aza-Michael entre os grupos amina da QT com os grupos vinílicos do PVA-MA que, por sua vez, acarreta a formação do hidrogel.

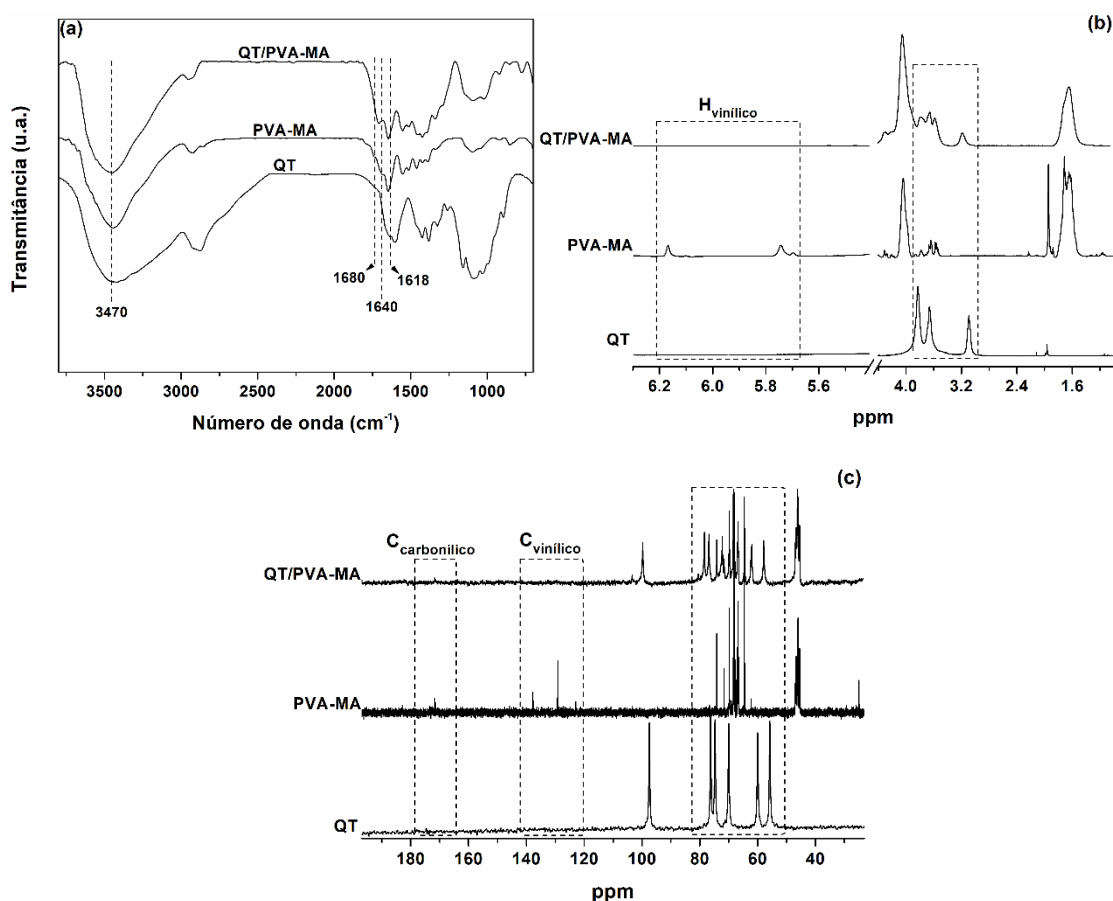


Figura 9. Espectros de FTIR (a), RMN de ^1H (b) e ^{13}C (c) da QT, PVA-MA e do hidrogel QT/PVA-MA.

Os espectros de RMN de ^1H da QT, do PVA-MA e do hidrogel QT/PVA-MA são mostrados na **Figura 9b**. Os principais sinais observados e suas atribuições estão descritos na **Tabela A.1** no **Apêndice A**. Como observado, o espectro da QT exibiu um sinal de ressonância em 3,08 ppm associado ao hidrogênio do carbono ligado ao grupo amina ($-\text{CH}-\text{NH}_2$) e um conjunto de sinais entre 3,60 e 3,90 ppm que correspondem aos hidrogênios da unidade sacarídica (Zhang, Junmei *et al.*, 2019). No espectro do PVA-MA é possível verificar dois sinais de ressonância em 5,74 e 6,17 ppm relacionados aos hidrogênios ligados aos carbonos vinílicos ($-\text{C}=\text{CH}_2$). Os sinais de ressonância que aparecem nesse espectro entre 3,54 e 3,80 ppm são atribuídos aos átomos de hidrogênio do espaçador glicerila da porção metacrilatada do PVA-MA (Zhang, Junmei *et al.*, 2019). Por fim, o sinal em 4,03 ppm está relacionado aos hidrogênios da cadeia polimérica principal do PVA-MA (Reis *et al.*, 2009). O espectro de RMN de ^1H do

hidrogel QT/PVA-MA possui alguns dos sinais de ressonância da QT e PVA-MA das cadeias poliméricas. Contudo, esses sinais são observados em deslocamentos químicos maiores em comparação com os espectros da QT e do PVA-MA. Outro ponto importante é a ausência dos sinais de ressonância dos hidrogênios atribuídos aos grupos vinílicos. Essa observação indica a ocorrência da reticulação entre a QT e o PVA-MA através da reação de adição de aza-Michael.

Os espectros de RMN de ^{13}C da QT, PVA-MA e do hidrogel QT/PVA-MA são apresentados na **Figura 9c**. Os principais sinais observados e suas atribuições estão sumarizados na **Tabela A.2** no **Apêndice A**. No espectro da QT é possível visualizar os sinais característicos da estrutura desse polissacarídeo na faixa de 70,00–105,00 ppm (Saber-Samandari; Yilmaz; Yilmaz, 2012). O espectro do PVA-MA exibiu os sinais dos carbonos vinílicos em 130,00 e 138,00 ppm (Reis *et al.*, 2009). Os sinais dos carbonos da cadeia polimérica do PVA-MA podem ser observados em 43,90 ppm ($-\text{CH}_2-$) e em 68 ppm ($-\text{CH}-$). Além disso, os sinais do espaçador glicerila também podem ser notados no espectro do PVA-MA na faixa espectral de 65,00–75,00 ppm (Reis *et al.*, 2009). O sinal de ressonância de baixa intensidade em 168 ppm é devido ao carbono da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) da porção metacrilatada do PVA-MA (Zhang, Junmei *et al.*, 2019). Em comparação com os espectros dos polímeros puros, o hidrogel QT/PVA-MA não possui os sinais dos grupos vinílicos do PVA-MA, sugerindo o seu consumo por conta da reação de adição de aza-Michael com os grupos amina da QT. Em contrapartida, esse mesmo espectro apresentou os sinais de ressonância provenientes da estrutura polimérica da QT e do PVA-MA (incluindo do espaçador glicerila) com uma pequena diferença nos deslocamentos químicos em relação àqueles observados para os polímeros. De forma geral, os sinais foram observados em maiores deslocamentos químicos. Essas discrepâncias são decorrentes da reação de reticulação entre a QT e o PVA-MA que altera o ambiente químico dos carbonos presentes na estrutura de cada polímero. De fato, o espectro do hidrogel QT/PVA-MA é condizente com o espectro de compostos obtidos pela reação de adição de Michael de aminas com compostos metacrilados (Love *et al.*, 2019; Puskas; Seo; Sen, 2011). Em síntese, os dados obtidos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C são consonantes

com os resultados do espectro de FTIR e confirmam a eficiente reticulação da QT e PVA-MA por meio da reação de adição de aza-Michael.

Levando em consideração todos os aspectos descritos e discutidos anteriormente, a hipótese central para o processo de reticulação e formação do hidrogel QT/PVA-MA é a interação do H_3BO_3 com os grupos carbonila presentes na estrutura do PVA-MA, ricos em elétrons, por conta da deficiência de elétrons do átomo de boro. Idealmente, essa interação promove um efeito retirador de elétrons até os grupos vinílicos do PVA-MA que facilita o ataque nucleofílico dos grupos amina da QT (Ren *et al.*, 2015). Assim, para elucidar o papel do H_3BO_3 na formação do hidrogel QT/PVA-MA, a reação entre a QT e o PVA-MA foi monitorada por RMN de ^{13}C . Para isso, alíquotas da reação foram recolhidas em específicos intervalos de tempo e, então, analisadas. Como observado na **Figura 10**, o sinal do grupo carbonila foi observado em um deslocamento químico maior após a adição de H_3BO_3 . Como observado, após a adição de H_3BO_3 , esse sinal foi deslocado de 168 para 173 ppm e, após 24 h, para 175 ppm. No espectro do hidrogel, esse sinal é observado em 170 ppm, indicando a ausência de conjugação com ligações duplas. Por conta dessa quebra de conjugação, que também resulta no maior deslocamento do sinal do carbono da carbonila, esses resultados não são suficientes para demonstrar a interação do H_3BO_3 com o grupo carbonila do PVA-MA. Uma tentativa de efetuar RMN de ^{11}B com o meio reacional foi realizada, porém, a baixa quantidade de H_3BO_3 impossibilitou a obtenção dos sinais esperados. Aparentemente, a quantidade catalítica de H_3BO_3 no meio reacional dificulta a obtenção de claros deslocamentos. Chaudhuri *et al.* (2007) demonstrou que H_3BO_3 atua como um eficiente catalisador para a adição de aminas com compostos carbonílicos α,β insaturados em água, onde a complexação do ácido com a carbonila foi proposta como passo fundamental para a reação ocorrer. Considerando esses aspectos, a complexação do H_3BO_3 com o grupo carbonila do PVA-MA é, provavelmente, muito importante para a reação de adição de aza-Michael proposta. O deslocamento do sinal do carbono da carbonila do PVA-MA logo após a adição do H_3BO_3 ao meio reacional pode ser um indicativo dessa complexação. Nos espectros na **Figura 10** é também possível observar que a intensidade dos sinais

dos carbonos vinílicos diminui com o aumento do tempo reacional, logo, confirmando o consumo desses grupos por conta da reação de adição.

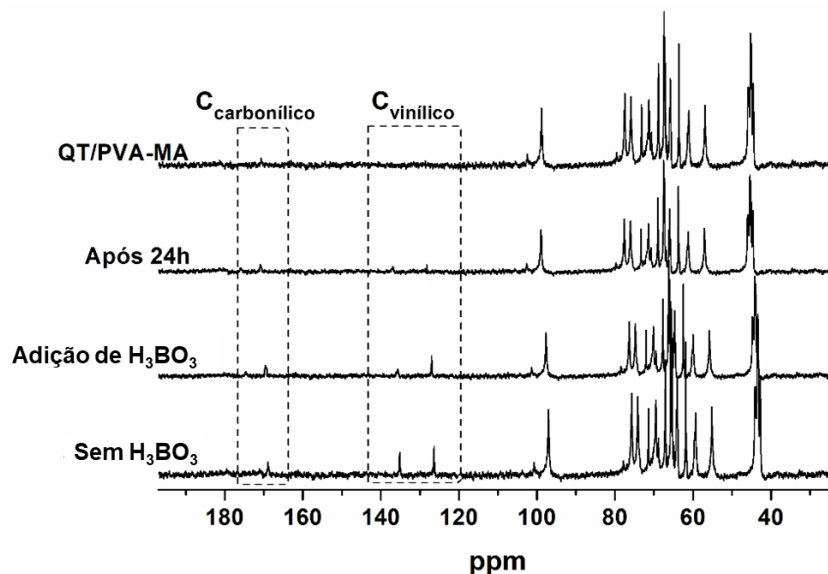


Figura 10. Espectros de RMN de ^{13}C do meio de reação na ausência e na presença de H_3BO_3 .

Não obstante, o H_3BO_3 pode formar complexos com os grupos amina da QT por conta de seu caráter de Lewis, o que poderia prejudicar a formação do hidrogel por meio da reação de aza-Michael envolvendo os grupos amina como nucleófilo. Curiosamente, apesar do uso difundido do H_3BO_3 como catalisador de reações envolvendo aminas, a complexação *in situ* desse ácido inorgânico com esses compostos básicos orgânicos é pouco investigada ou mencionada, incluindo em reações de adição de Michael realizadas em meio aquoso ou alcoólico (Chaudhuri *et al.*, 2005; Hall, 2019; Ishihara; Lu, 2016). Uma possível explicação para isso é a formação de complexos instáveis entre o H_3BO_3 e a amina que são desestabilizados por efeitos estéricos ou pelas condições experimentais, como, por exemplo, temperatura e pH (Lopalco *et al.*, 2020; Sabatini; Boulton; Sheppard, 2017; Sonoda *et al.*, 1998). Por exemplo, FILIPPOV *et al.* (2019) reportou que em altas temperaturas ($\geq 60\text{ }^\circ\text{C}$), os complexos formados por H_3BO_3 e compostos contendo grupos amina são fracos (instáveis) e decompõem por conta do aquecimento (Filippov; Antzutkin; Shah, 2020). Por outro lado, alguns autores relatam que na amidação de ácidos carboxílicos com aminas utilizando H_3BO_3 como catalisador, o ácido forma um aduto com a amina que não interfere na atividade catalítica deste, mesmo em altas temperaturas (>

80 °C). Nesse caso, um excesso da amina é necessário (Du *et al.*, 2019; Todorovic; Perrin, 2020). Contudo, o aduto formado é sensível a presença de água, onde a sua mínima quantidade promove a hidrólise do aduto (Sabatini; Boulton; Sheppard, 2017). Em geral, essas inconsistências estão relacionadas com o comportamento químico único e irregular dos compostos contendo boro (Lopalco *et al.*, 2020).

Outro importante parâmetro que afeta a complexação do H_3BO_3 com aminas é o pH do meio reacional (Filippov; Antzutkin; Shah, 2020). Em meios ácidos, as aminas estão protonadas e seu caráter básico é perdido. Assim, a complexação do H_3BO_3 com a amina é prejudicada (Halimehjani; Gholami; Saidi, 2012). Considerando a melhor condição de pH para a síntese do hidrogel QT/PVA-MA (pH 4), uma fração dos grupos amina da QT está em sua forma protonada, criando uma carga positiva resultante na estrutura do polissacarídeo que pode restringir a complexação do H_3BO_3 com o restante dos grupos amina desprotonados. Os grupos amina desprotonados atuam como nucleófilos na reação de aza-Michael e na reticulação da QT com o PVA-MA. Vários trabalhos na literatura relatam a influência do pH do meio na basicidade e na nucleofilicidade da QT (Sathiyavimal *et al.*, 2020). Todos os resultados experimentais obtidos indicam a complexação preferencial do H_3BO_3 com o grupo carbonil do PVA-MA, logo, facilitando o ataque nucleofílico dos grupos amina da QT. Finalmente, como uma observação adicional dos espectros de RMN de ^{13}C descritos na **Figura 10**, a intensidade dos sinais associados aos carbonos vinílicos diminui constantemente ao passo que o tempo de reação aumenta até o seu desaparecimento no espectro do hidrogel QT/PVA-MA.

Tendo em vista todos os resultados experimentais e considerações sobre a formação do hidrogel QT/PVA-MA, um mecanismo simplificado para o processo de reticulação da QT com o PVA-MA por meio da reação de adição de aza-Michael catalisada por H_3BO_3 foi proposto (Liu *et al.*, 2017). Esse mecanismo é apresentado na **Figura 11**, onde as estruturas da QT e PVA-MA foram simplificadas. Em síntese, o processo de reticulação ocorre a partir da complexação do H_3BO_3 com o oxigênio do grupo carbonil da porção metacrilatada do PVA-MA. Essa interação proporciona um efeito retirador de elétrons que facilita o ataque nucleofílico da QT nessa porção do PVA-MA.

Assim, os grupos amina da QT atacam o carbono β da porção metacrilatada do PVA-MA que resulta na formação de um intermediário de vida curta. Esse intermediário prontamente abstrai um hidrogênio do meio reacional, sendo convertido em um composto enolizado que rapidamente sofre uma tautomerização para gerar o produto e os pontos de reticulação do hidrogel QT/PA-MA. É especulado que, durante a etapa de adição, ocorre a formação de uma ligação B–O entre H_3BO_3 e o oxigênio da carbonila, que é hidrolisada facilmente, promovendo a regeneração do H_3BO_3 para um novo ciclo catalítico (Chaudhuri *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2015). Ainda, de acordo com o mecanismo proposto, outra rota possível seria a adição nucleofílica direta dos grupos amina da QT no grupo carbonil do PVA-MA, que resultaria em uma ligação amida. Todavia, os resultados das análises de RMN de ^1H e ^{13}C do hidrogel QT/PVA-MA não suportam essa rota, haja visto que os sinais do espaçador glicerila, presente na estrutura do PVA-MA, estão presentes nos espectros de ^1H e ^{13}C . Em geral, o elevado impedimento estérico dos polímeros, por conta de sua estrutura volumosa, possui uma grande influência na etapa de adição (Ye *et al.*, 2016). De fato, esse efeito pode explicar o tempo de reação (48 h) e a elevada temperatura (60 °C) necessários para a reação de reticulação resultar em um grande rendimento na síntese do hidrogel. Considerando todos esses aspectos, os grupos vinílicos no PVA-MA são muito mais acessíveis ao ataque nucleofílico dos grupos amina da QT.

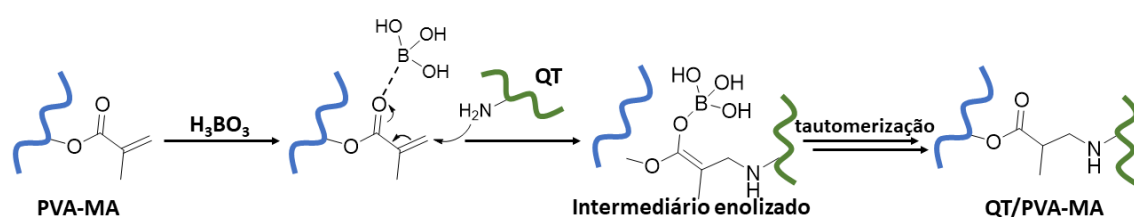


Figura 11. Mecanismo proposto para a síntese do hidrogel utilizando H_3BO_3 como catalisador.

De modo geral, todos os resultados experimentais indicam que o H_3BO_3 é capaz de atuar como um catalisador eficiente para a reação de aza-Michael entre a QT e o PVA-MA permitindo a obtenção de um hidrogel quimicamente reticulado. Essa estratégia original não requer a funcionalização prévia dos

polímeros com “agentes químicos finos” para introduzir grupos funcionais específicos como, por exemplo, grupos tióis ($-SH$), que são necessários na maioria das reações de adição de Michael visando a formação de hidrogéis. Portanto, essa é uma interessante característica, como também, vantagem da metodologia descrita aqui. Ademais, um simples processo de diálise em água foi suficiente para remover o catalisador H_3BO_3 do hidrogel formado. Vale a pena ser mencionado que a concentração de H_3BO_3 utilizada para a obtenção do hidrogel não é suficiente para promover nenhum efeito tóxico significativo em humanos (Geng *et al.*, 2017). Todos esses aspectos são altamente atrativos para o uso dessa estratégia para a obtenção de hidrogéis baseados em polissacarídeos. Considerando a biocompatibilidade e atoxicidade dos polímeros utilizados no preparo do hidrogel (QT e PVA-MA) é possível especular que esse material pode ser utilizado como um potencial biomaterial.

3.3.2. Caracterização do hidrogel

3.3.2.1. Propriedades térmicas

As propriedades térmicas do hidrogel QT/PVA-MA foram investigadas por meio da técnica termoanalítica de TG, uma vez que essa análise permite a investigação do comportamento térmico de uma amostra, que, por sua vez, depende de sua natureza química. Nesse sentido, a reticulação química entre QT e PVA-MA certamente afeta o comportamento térmico do hidrogel em comparação com os materiais precursores. As curvas de TG e DTG da QT, PVA-MA e do hidrogel QT/PVA-MA são mostradas na **Figura 12**. A **Tabela 2** sumariza as faixas de temperaturas onde os estágios de perda de massa foram observados e as respectivas perdas de massa (em porcentagem).

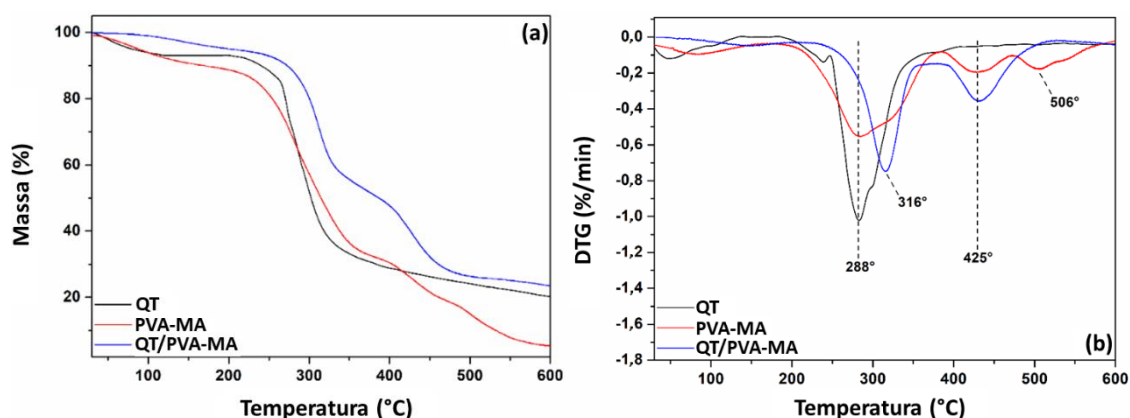


Figura 12. Curvas de TG (a) e DTG (b) da QT, do PVA-MA e do hidrogel QT/PVA-MA.

Tabela 2. Estágios de perda de massa da QT, PVA-MA e do hidrogel QT/PVA-MA preparado.

Amostras	Estágio	Faixa de temperatura (°C)	Perda de massa (%)
QT	1	50–110	6
	2	230–400	77
PVA-MA	1	40–130	9
	2	193–375	68
	3	388–460	82
	4	471–560	92
Hidrogel QT/PVA-MA	1	80–180	4
	2	235–355	57
	3	398–500	75

Como é possível verificar na **Figura 12** e **Tabela 2**, a QT apresentou dois estágios de perda de massa. O primeiro estágio de perda de massa decorre da perda de água absorvida na amostra, enquanto o segundo estágio está associado com a despolimerização e degradação da cadeia carbônica da QT (de Souza; da Silva; Fajardo, 2017b). Para o PVA-MA, quatro estágios de perda de massa podem ser observados (**Figura 12** e **Tabela 2**). O primeiro estágio está associado com a evaporação de água absorvida. O segundo estágio é devido a eliminação dos grupos $-OH$ do PVA-MA e a quebra dos pontos de funcionalização da cadeia carbônica principal com as porções metacriladas (STEFANOVIĆ *et al.*, 2015). Como consequência, polietilenos de diferentes tamanhos são gerados que, por sua vez, são degradados no terceiro estágio de

perda de massa do PVA-MA (STEFANOVIĆ *et al.*, 2015). Por fim, compostos carbonáceos residuais (por exemplo, etileno) são degradados no quarto e último estágio (STEFANOVIĆ *et al.*, 2015). Em comparação com a QT e o PVA-MA, o hidrogel QT/PVA-MA apresentou um perfil térmico distinto, como mostra a **Figura 12** e a **Tabela 2**. Em geral, o hidrogel possui três estágios de perda de massa, onde o primeiro é por conta da evaporação de água absorvida. O segundo e terceiro estágios de perda de massa estão relacionados com a degradação das cadeias poliméricas e da estrutura do hidrogel. Ademais, tais estágios de perda de massa ocorrem em maiores temperaturas que os materiais precursores QT e PVA-MA, provavelmente, por causa da reticulação química irreversível entre os polímeros constituintes da matriz do hidrogel, tornando-os menos suscetíveis à degradação térmica (Xu *et al.*, 2018).

3.3.2.2. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas do hidrogel QT/PVA-MA preparado foram investigadas por análises reológicas dinâmicas e análises de compressão. Os resultados desses experimentos são mostrados na **Figura 13**. As análises reológicas dinâmicas realizadas mostram a dependência dos módulos G' e G'' do hidrogel QT/PVA-MA em função da variação da frequência (**Figura 13a**). Como é possível verificar, o hidrogel apresentou um típico comportamento viscoelástico, onde o módulo G' é maior que o módulo G'' em todo o intervalo de frequência testado, logo, confirmando a elevada estabilidade do hidrogel (SUN HAN CHANG *et al.*, 2019). Curiosamente, em maiores frequências (> 6 Hz), ambos módulos G' e G'' aumentam. Esse comportamento pode indicar uma transição de estrutura no hidrogel, provavelmente, por conta de sua ruptura quando submetida há uma elevada tensão em grandes frequências (SUN HAN CHANG *et al.*, 2019). Apesar disso, o módulo G' permanece com um maior valor em comparação com G'' devido à grande estabilidade da matriz do hidrogel densamente reticulada. De fato, a partir da análise de compressão do hidrogel QT/PVA-MA (**Figura 13b**) é possível averiguar que o material sustenta uma alta deformação (cerca de 52%) até a sua ruptura. Adicionalmente, utilizando os dados da análise de compressão, o módulo de Young ($4,40 \pm 1,45$ Pa), a força de ruptura ($2,94 \pm 0,52$ N) e a deformação até a ruptura ($52,00 \pm 5,00$ %).

Portanto, todos esses resultados indicam que o hidrogel QT/PVA-MA possui uma estrutura forte e robusta, características mecânicas interessantes para potenciais biomateriais, tais como curativos ou até mesmo substratos para cultivo celular (HU *et al.*, 2019). Realmente, as propriedades mecânicas desse hidrogel são similares com outros materiais utilizados para essa aplicação, como mostrado na **Tabela A.3** no **Apêndice A**.

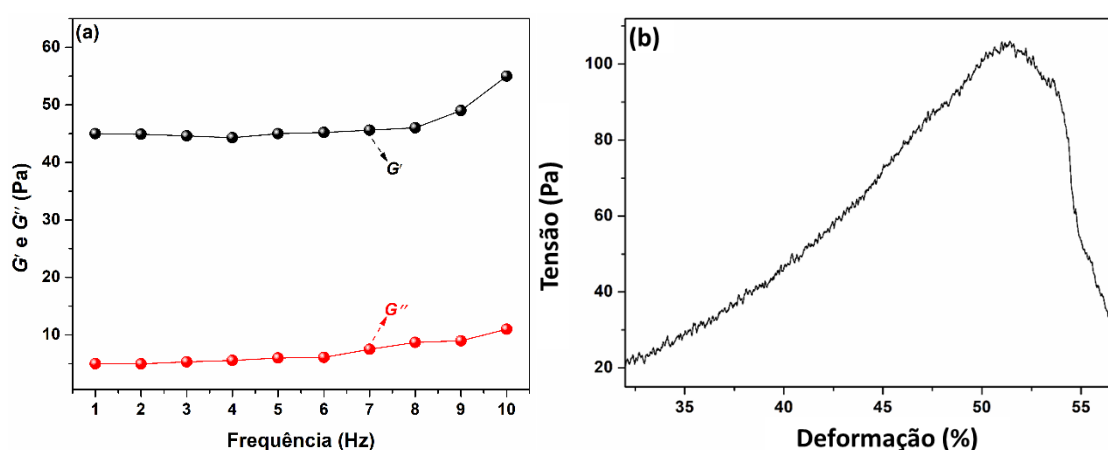


Figura 13. Curvas dos módulos G' e G'' em função da frequência (a) e curva tensão-deformação (b) do hidrogel QT/PVA-MA.

3.3.2.3. Intumescimento e estabilidade

A capacidade de absorção de líquidos é uma importante característica de hidrogéis com potencial aplicação biomédica, uma vez que tais materiais estão em constante contato com fluídos biológicos (por exemplo, sangue, exsudatos de feridas, entre outros) (HU *et al.*, 2019). Assim, para investigar a capacidade de absorção de líquido do hidrogel QT/PVA-MA, ensaios de intumescimento foram realizados com amostras do hidrogel preparado incubadas em PBS (pH 7,4 e 37 °C). Em termos gerais, intumescimento é uma propriedade característica de materiais poliméricos e é definida como o aumento de massa de uma amostra devido a absorção de líquido. A curva de intumescimento do hidrogel QT/PVA-MA em função do tempo é mostrada na **Figura 14a**. Como observado, em um curto intervalo de tempo de imersão em PBS (~ 20 min), o hidrogel apresentou um grande grau de intumescimento (420%). O grau máximo de intumescimento (665%) é atingido após 120 min do início do experimento. Após esse período, o

equilíbrio é alcançado e o processo de absorção de líquido cessa. Em geral, o perfil de intumescimento do hidrogel QT/PVA-MA é similar a diversos hidrogéis baseados em polissacarídeos, onde do intumescimento (e, por conseguinte, da absorção de líquido) ocorre nos instantes iniciais do experimento, sendo seguido por um intumescimento moderado até o equilíbrio (Basu; Saha; Saha, 2020). Basicamente, esse comportamento está relacionado com os grupos amina e hidroxila da matriz polimérica, tornando-a hidrofílica. Tais grupos funcionais atraem as moléculas de água (presentes no meio de intumescimento) e, como consequência, a matriz do hidrogel expande até a sua saturação (FAJARDO *et al.*, 2010).

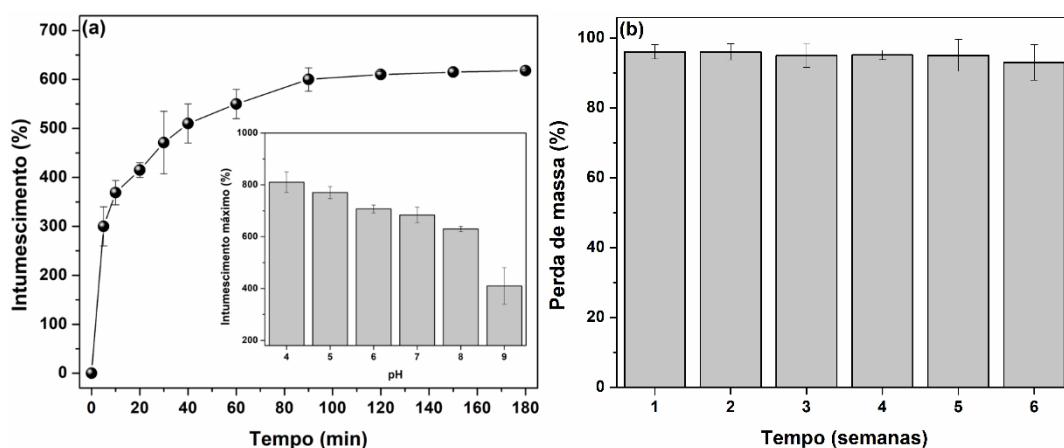


Figura 14. Curvas de intumescimento do hidrogel QT/PVA-MA (a) e perda de massa (b) do hidrogel QT/PVA-MA em PBS (pH 7,4) na temperatura de 37 °C. O *inset* mostra o intumescimento máximo do hidrogel em diferentes condições de pH.

A influência do pH no grau máximo de intumescimento do hidrogel QT/PVA-MA também foi investigada na faixa de pH 4 até pH 9, já que essa faixa engloba desde o pH de regiões no corpo humano contendo tumores até o pH do sangue (Cao, Zhiwen *et al.*, 2019). Os resultados desses experimentos estão descritos no *inset* da **Figura 14a** e, como observado, o grau máximo de intumescimento do hidrogel diminui quando o pH do meio de incubação aumenta de pH 4 até pH 9. Em condições ácidas (especificamente, $\text{pH} \leq 6$), os grupos amina livres da QT estão protonados ($\text{pK}_a \approx 6,5$) (Kalliola *et al.*, 2018). Consequentemente, a repulsão cátion-cátion favorece a expansão da matriz do

hidrogel QT/PVA-MA e a absorção de líquido. Em contrapartida, quando o pH do meio aumenta ($\text{pH} > 6$), os grupos amina da QT não estão em sua forma protonada e a expansão da matriz polimérica é restrita. Nessas condições, a absorção de líquido e grau de intumescimento são dependentes da hidrofilicidade do hidrogel. Apesar disso, a grande capacidade de absorção de líquido e intumescimento do hidrogel QT/PVA-MA em pH moderadamente ácido (por exemplo, pH 4–5) é uma interessante característica para potenciais curativos, já que vários tipos de feridas (principalmente, feridas infeccionadas) e alguns tecidos transplantados (por exemplo, pele) apresentam essa condição de pH (HU et al., 2019).

Ainda, com o intuito de investigar a estabilidade do hidrogel QT/PVA-MA, a sua perda de massa em PBS (pH 7,4 e 37 °C) foi avaliada e os resultados obtidos são mostrados na **Figura 14b**. Durante todo o experimento, o hidrogel preparado apresentou uma pequena perda de massa de 97% até 94% após a primeira semana de incubação em PBS, logo, sugerindo uma elevada estabilidade do material preparado em condições fisiológicas. Genericamente, hidrogéis quimicamente reticulados possuem uma maior estabilidade e sua degradação é mínima, já que os pontos de reticulação são formados por ligações químicas irreversíveis (HU et al., 2019). A grande estabilidade do hidrogel QT/PVA-MA foi indicada pelos resultados das análises mecânicas e de TG.

3.3.2.4. Morfologia

Um parâmetro muito importante que deve ser avaliado em hidrogéis com potencial aplicação biomédica é a sua morfologia. Por exemplo, a rugosidade e organização interna de um hidrogel podem influenciar o processo de diferenciação celular, enquanto a presença de poros (e o seu tamanho) ditam a velocidade em que um fármaco encapsulado é liberado da matriz polimérica (Fu et al., 2019). Levando em consideração esses aspectos, a morfologia do hidrogel QT/PVA-MA foi investigada por MEV. Ao analisar as imagens obtidas do hidrogel (**Figura 15**), nota-se a presença de uma estrutura interna irregular, onde poros de diferentes formas e tamanhos estão randomicamente distribuídos pela matriz polimérica. É importante mencionar que, para a obtenção das imagens obtidas

por MEV, o hidrogel foi congelado e liofilizado. Portanto, a morfologia do material também é afetada por esse histórico de processamento. Ao examinar as imagens obtidas em uma maior magnificação (**Figura 15b**), é possível constatar que o hidrogel QT/PVA-MA possui uma morfologia rugosa e sem nenhuma separação de fase aparente. Em especial, essa última observação indica que o processo de reticulação química entre a QT e o PVA-MA ocorreu de forma homogênea. Não obstante, a irregularidade e a presença de poros na estrutura do hidrogel QT/PVA-MA são particularmente atrativas para potenciais biomateriais, já que essa morfologia favorece a difusão de substâncias na matriz polimérica, podendo facilitar a diferenciação e crescimento celular (Fu *et al.*, 2019). Essa característica sugere a potencial aplicação do hidrogel como curativo ou, ainda, como *scaffolds* para o crescimento e diferenciação celular.

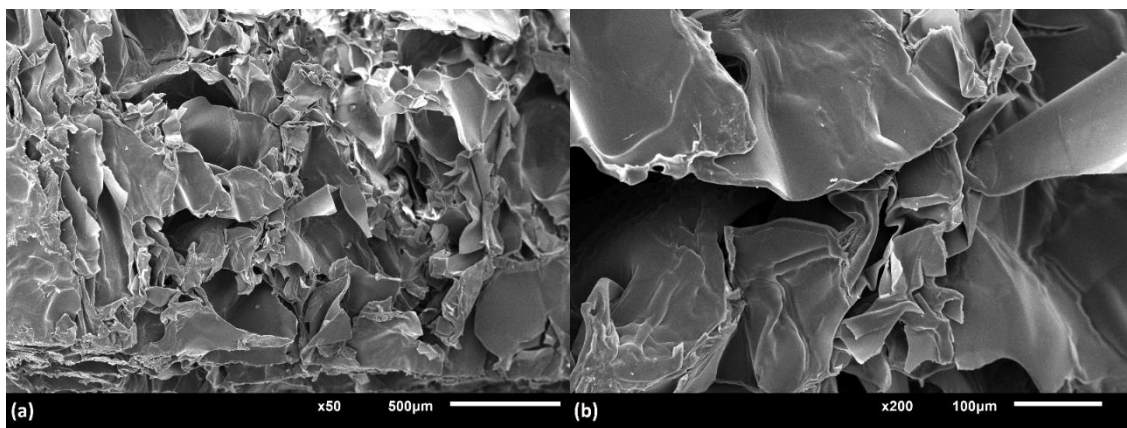


Figura 15. Imagens de MEV do hidrogel QT/PVA-MA preparado em diferentes magnificações.

3.4. Conclusão

Neste Capítulo, o desenvolvimento e síntese de um hidrogel formado por quitosana (QT) e um PVA metacrilatado (PVA-MA) é descrito. O hidrogel quimicamente reticulado foi obtido a partir da reação de adição de aza-Michael entre os grupos amina da QT e os grupos vinílicos do PVA-MA usando H_3BO_3 . Considerando todos os resultados obtidos, é possível verificar o importante papel catalítico do H_3BO_3 no processo de reticulação e na eficiência da gelificação. Em síntese, o uso do H_3BO_3 como catalisador da reação de reticulação é uma simples e eficiente estratégia para a formação e obtenção do hidrogel. Por outro lado, as análises de caracterização desse material (TG, intumescimento, perda de massa e propriedades mecânicas) revelaram sua grande capacidade de absorção de líquido e estabilidade mecânica. Ainda, segundo as análises morfológicas, o hidrogel sintetizado não apresentou nenhuma separação de fase por causa da grande compatibilidade entre QT e o PVA funcionalizado. Todas essas características sugerem que o hidrogel sintetizado possui potencial para seu uso como biomaterial, tanto como substrato para cultivo celular ou, ainda, como curativo para o revestimento de ferimentos. Entretanto, essas conclusões são inferências baseadas nos resultados obtidos e mais estudos, em especial, de toxicidade, são fundamentais para verificar a aplicabilidade do hidrogel preparado. Apesar disso, o objetivo principal deste estudo – verificar a viabilidade do H_3BO_3 como catalisador da reação de aza-Michael e sua influência na obtenção de um hidrogel baseado em polissacarídeos – foi atingido.

Capítulo 4 – Hidrogéis de pectina reticulados com ligações dissulfeto: Potenciais veículos redox-responsivos para liberação de fármacos

4.1. Introdução

Como já mencionado nos Capítulos anteriores, hidrogéis quimicamente reticulados tendem a ser materiais estáveis e, por conta disso, são muito aplicados como biomateriais. Todavia, para liberação controlada de fármacos, a degradação controlada do hidrogel é, geralmente, pretendido para facilitar a liberação do fármaco ou agente biológico encapsulado (Hu *et al.*, 2019a). Por conta disso, várias reações químicas reversíveis de reticulação têm sido exploradas na síntese de hidrogéis quimicamente reticulados (George *et al.*, 2020a). Todas essas estratégias de reticulação química resultam no preparo de um hidrogel passível de um processo de degradação controlado e sustentado, já que sua matriz é formada por ligações covalentes dinâmicas que podem ser desfeitas e refeitas (Ye *et al.*, 2020). Outro aspecto interessante desse tipo de hidrogel é que as ligações entre as cadeias poliméricas são revertidas em condições específicas. Portanto, esses hidrogéis são responsivos às condições do meio onde se encontram; um atributo muito atrativo para potenciais sistemas de liberação controlada (Ye *et al.*, 2020).

Neste segundo Capítulo, a síntese de um hidrogel quimicamente reticulado por meio de uma rota química que resulta na formação de ligações dissulfeto ($-S-S-$) entre as cadeias poliméricas é descrito. As ligações dissulfeto atuam como pontos de junção da rede polimérica do hidrogel e possibilitam a sua obtenção. Em geral, a formação de hidrogéis reticulados por esse tipo de ligação é uma interessante estratégia para a obtenção de materiais dinâmicos. Na natureza, por exemplo, a formação de ligações dissulfeto é um robusto mecanismo para a estabilização de proteínas que pode ser reversível em um ambiente redutor, como é o caso do meio fisiológico humano (Cao, Yu *et al.*, 2019a). Consequentemente, a reticulação química por ligações dissulfeto é uma interessante rota de síntese de hidrogéis responsivos, onde tais ligações podem ser quebradas mediante uma mudança no meio (variação de pH ou presença de agentes redutores, por exemplo). Essa característica instiga o uso desse tipo de

material como sistema de liberação controlada, haja visto que o processo de liberação de um fármaco encapsulado, por exemplo, será vinculado ao processo de degradação gradual da matriz do hidrogel proporcionada pela desestabilização das ligações dissulfeto, isto é, dos pontos de reticulação (Cao, Yu *et al.*, 2019a).

Ainda, tendo em vista as vantagens associadas ao uso de polissacarídeos na construção de hidrogéis, neste estudo, a pectina (Pct), um polissacarídeo natural extraído de várias fontes e resíduos vegetais (por exemplo, cascas de frutos cítricos) (Lessa *et al.*, 2017), foi utilizada. Recentemente, o interesse pelo uso da Pct em aplicações farmacêuticas e médicas tem aumentado devido a atoxicidade e abundância desse polissacarídeo. Alguns autores relatam que a Pct possui uma habilidade natural em promover a adesão, diferenciação e crescimento celular, que são aspectos atrativos para um biomaterial (Munarin; Tanzi; Petrini, 2012). Para viabilizar a síntese do hidrogel reticulado por ligações dissulfeto, a Pct foi funcionalizada quimicamente com L-cisteína (Cyst), um aminoácido não-essencial, a fim de inserir grupos tióis ($-SH$) em sua estrutura. Posteriormente, a formação das ligações dissulfeto foi induzida pela adição de persulfato de potássio (KPS) diretamente na solução da Pct funcionalizada (denominada de Pct-SH). O KPS inicia a oxidação dos grupos tióis da Pct-SH resultando na formação das ligações dissulfeto. Em geral, essa rota química de síntese de hidrogéis é pouco explorada na literatura. A maioria das publicações que abordam a formação de hidrogéis por ligações dissulfeto relatam sua obtenção pela mistura de um polímero contendo grupos tióis com outro polímero, ou agente reticulante, que já contém ligações dissulfeto. A partir de um mecanismo de interconversão, a rede polimérica do hidrogel é formada (Choh; Cross; Wang, 2011a). Apesar dessa estratégia possuir um bom rendimento e eficiência, moléculas orgânicas são liberadas durante o processo de interconversão; uma circunstância indesejada na formação de um biomaterial (MacKaya-Navarro; Campos-Requena, 2020) e que é evitada na metodologia proposta. Os hidrogel preparado foi completamente caracterizado por análises espectroscópicas e mecânicas. Além disso, todos resultados obtidos demonstraram a potencial aplicação desse material como sistema de liberação controlada de fármacos responsivo à condição redox do meio.

4.2. Experimental

4.2.1. Materiais

Casca de laranja (*Citrus sinensis*) foram obtidas do restaurante universitário da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). A pectina (Pct) foi isolada das cascas de laranja e completamente desesterificada de acordo com o método proposto por LESSA *et al.* (2017). O peso molecular da Pct desesterificada foi estimado por meio de análises viscosimétricas através do método proposto por LIT *et al.* (1997) na temperatura de 25 °C e pH 5. As constantes de Mark-Houwink utilizadas foram $K = 1,4 \times 10^{-6} \text{ dL g}^{-1}$ e $\alpha = 1,43$ (Sayah *et al.*, 2016). O peso molecular viscosimétrico médio (Mv) da Pct obtida foi estimado como 31,5 kDa. Cloridrato de L-cisteína, cloridrato de 1-etil-3-carbodimida (EDC), persulfato de potássio (KPS) e ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Etanol, ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos da Synth (Brasil). Acetaminofeno (ACT) foi adquirido da Sanofi Aventis Pharma (Índia). Com exceção da Pct, todos os outros reagentes são de pureza analítica.

4.2.2. Funcionalização química da Pct com grupos tióis

Para inserir grupos tióis na estrutura da Pct, esse polissacarídeo foi modificado quimicamente com a L-cisteína utilizando o método proposto por SCHNURCH *et al.* (2001) com algumas modificações. A **Figura 16** mostra o esquema geral da funcionalização química da Pct com a L-cisteína, cujo produto foi denominado de Pct-SH. Resumidamente, Pct (5,0 g) foi solubilizada em água destilada (500 mL). Em seguida, EDC (5,0 g) foi adicionado na solução de Pct para ativar os seus grupos carboxílicos. A solução resultante foi mantida sob agitação constante por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, L-cisteína (2,5 g) foi adicionada, o pH do meio foi ajustado para pH 4 utilizando HCl (1 mol L⁻¹) e, então, a solução permaneceu sob agitação constante por 48 h a 60 °C, no escuro. A Pct funcionalizada com grupos tióis foi precipitada usando etanol e o produto recuperado foi purificado por meio de lavagens com etanol. A Pct-SH purificada foi congelada e liofilizada (- 55 °C, 48 h). **Rendimento:** 4,0 g (80 %).

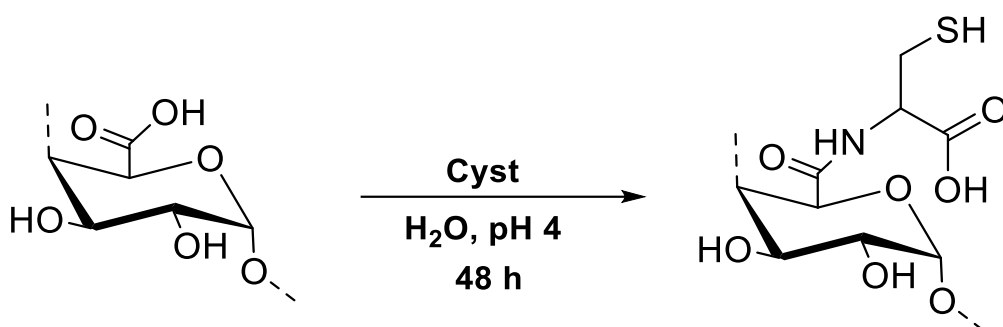


Figura 16. Esquema geral da reação de funcionalização da Pct com grupos tióis.

4.2.3. Quantificação espectrofotométrica dos grupos tióis livres

Para quantificar a concentração de grupos tióis na Pct-SH, um método espectrofotométrico foi utilizado (Sun; Huang, 2016a). Para isso, uma solução de Pct-SH foi preparada em água destilada (1 mg mL^{-1}). Separadamente, DNTB foi solubilizado em água destilada sob agitação constante para obter uma solução homogênea (4 mg mL^{-1}). Em seguida, as soluções de Pct-SH ($0,5 \text{ mL}$) e DNTB ($0,1 \text{ mL}$) foram misturadas a uma solução PBS (5 mL , pH 8). Após 15 min de incubação a temperatura ambiente, a absorbância dessa mistura em $\lambda = 412 \text{ nm}$ foi medida em um espectrofotômetro UV-Vis Agilent (Modelo Agilent-8453). Soluções de L-cisteína com diferentes concentrações ($2, 4, 6$ e 8 mmol L^{-1}) foram utilizadas para preparar uma curva de calibração ($R^2 = 0,999$). A partir dessa curva, a concentração de grupos tióis na Pct-SH foi estimada. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.4. Preparo do hidrogel quimicamente reticulado por ligações dissulfeto

Hidrogéis de Pct-SH foram preparados por meio da formação de ligações dissulfeto mediada por KPS. Neste estudo, o efeito de diferentes concentrações de Pct-SH ($5, 10$ e $15\% \text{ m/m}$) e KPS ($75, 150$ e 300 mmol L^{-1}) na eficiência e tempo de gelificação foi investigado. Para o preparo do hidrogel, uma solução de Pct-SH foi preparada em água destilada. Em seguida, gás nitrogênio foi borbulhado em cada solução por até 10 min com o intuito de diminuir a quantidade de oxigênio dissolvido no meio. Posteriormente, o frasco foi selado com um septo de borracha e a solução de KPS ($30 \text{ }\mu\text{L}$) foi adicionada através de

uma seringa. Após a homogeneização por 2 min em um vórtex, a solução resultante foi incubada a 70 °C até a sua gelificação. A formação do hidrogel e o tempo de gelificação foram determinados através do método de inversão do frasco (Ye *et al.*, 2016). Os hidrogéis obtidos foram purificados em água destilada por 24 h para remover o excesso de polímero que não foi reticulado, como também, qualquer quantidade de KPS que não reagiu. Os hidrogéis purificados foram secos por liofilização (-55 °C, 48 h) para a determinação do rendimento da síntese do hidrogel que, novamente, foi usado como um parâmetro quantitativo para demonstrar a eficiência do processo de gelificação e reticulação. O rendimento do gel foi estimado por meio da Eq. (1) descrita no Capítulo anterior (Capítulo 3, Seção 3.2.3). A formulação e nomenclatura dos hidrogéis Pct-SH preparados são descritas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Formulação e nomenclatura dos hidrogéis Pct-SH preparados.

Hidrogel	Formulação	
	Pct-SH (% m/m)	KPS (mmol L ⁻¹)
Pct-SH ₍₅₋₁₎	5	75
Pct-SH ₍₅₋₂₎	5	150
Pct-SH ₍₅₋₃₎	5	300
Pct-SH ₍₁₀₋₁₎	10	75
Pct-SH ₍₁₀₋₂₎	10	150
Pct-SH ₍₁₀₋₃₎	10	300
Pct-SH ₍₁₅₋₁₎	15	75
Pct-SH ₍₁₅₋₂₎	15	150
Pct-SH ₍₁₅₋₃₎	15	300

4.2.5. Técnicas de caracterização

Análises de FTIR e RMN de ¹H foram realizadas nas mesmas condições e utilizando os mesmos procedimentos descritos no Capítulo anterior. Todas as análises reológicas foram conduzidas em um reômetro HAAK RS 150 (Thermo Fisher, EUA) com geometria de placas paralelas (35 mm de diâmetro e *gap* de 2 mm). A amostra (6 mL) em diferentes tempos reacionais foi alocada entre as placas, sendo submetida a um estresse de 0,1 Pa, no intervalo de frequência de 1 até 10 Hz. Durante essas análises, os módulos *G'* e *G''* foram computados e

tan δ foi calculada como a razão entre os módulos (G''/G'). A alíquota foi retirada de um meio reacional preparado para cada tempo reacional analisado. Essas análises foram realizadas em triplicata e os resultados são valores médios. Ensaio de compressão mecânica foram realizadas no texturômetro TA.TX2 Stable Microsystems (Inglaterra). Ensaio de intumescimento e de perda de massa foram realizados por um procedimento similar ao relatado no Capítulo 3. Porém, esses experimentos foram realizados em PBS (pH 7,4) na temperatura de 37 °C na ausência ou presença dos agentes redutores fisiológicos glutathione reduzida (GSH) e L-cisteína (Cyst). A concentração desses agentes redutores no meio foi fixada em 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Da mesma maneira, a densidade de reticulação dos hidrogéis preparados foi estimada através do procedimento descrito no Capítulo 3 (seção 3.2.4).

4.2.6. Encapsulação e liberação de acetaminofeno (ACT)

Para o preparo dos hidrogéis Pct-SH contendo acetaminofeno (ACT), o método descrito anteriormente foi utilizado. Porém, antes da incubação na temperatura de 70 °C, uma quantidade de ACT (5 mg) foi adicionado na solução de Pct-SH. A concentração final de ACT na solução polimérica foi estimada como 10 mg mL^{-1} . Os hidrogéis preparados foram secos por liofilização (–55 °C, 48 h). Para os ensaios de liberação, as amostras secas do hidrogel (100 mg) foram imersas em PBS ou em PBS suplementado com GSH ou Cyst. Esse sistema foi mantido na temperatura constante de 37 °C e, em determinados intervalos de tempo, alíquotas do meio (4 mL) foram retiradas e analisadas em um espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 242 nm. Por meio de uma curva de calibração de ACT previamente construída em cada meio de liberação, a quantidade de ACT liberada dos hidrogéis foi estimada. Esses experimentos foram realizados em triplicata.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Obtenção da Pct quimicamente funcionalizada com grupos tióis

A funcionalização da Pct com grupos tióis é uma estratégia muito interessante, pois, permite a reticulação do polímero modificado por meio de ligações dissulfeto, as quais podem ser formadas utilizando um mecanismo radicalar. Nesse estudo, os grupos tióis foram introduzidos na Pct por meio da reação desse polissacarídeo com Cyst. A Cyst possui em sua estrutura, além do grupo tiol, grupos carboxila e amina. Em especial, os grupos amina da Cyst são passíveis de reagirem com os grupos carboxílicos da Pct resultando na inserção desse aminoácido (e dos grupos tióis) na estrutura do polissacarídeo por meio de uma ligação do tipo amida. Contudo, essa reação precisa ser realizada na presença de EDC, uma carbodiimida capaz de ativar os grupos carboxila da Pct, tornando-os suscetíveis ao ataque nucleofílico dos grupos amina da Cyst. A reação entre os grupos carboxílicos e EDC resulta em uma *O*-acilureia reativa e o ataque nucleofílico dos grupos amina nesse intermediário reativo resulta na ligação amida entre a Pct e a L-cisteína, liberando um derivado da ureia solúvel em água (MACKAYA-NAVARRO; CAMPOS-REQUENA, 2020). É importante mencionar que os grupos tióis da Cyst não interferem significativamente nessa reação de acoplamento, mesmo que, teoricamente, tais grupos também possam atacar o intermediário *O*-acilureia e originar um tioéster (Debele *et al.*, 2018). Existem duas razões para a baixa reatividade dos grupos tióis nessa reação: (i) o pH levemente ácido do meio reacional (pH ~ 4), onde a ionização dos grupos tióis ($pK_a = 6,4-7,4$) para tiolato, uma espécie com grande poder nucleofílico, é evitada (Wall *et al.*, 2012), e (ii) a incompatibilidade entre o grupo carbonila, um centro eletrofílico duro, e o grupo tiol, um nucleófilo mole em comparação com o grupo amina (Worch *et al.*, 2021). Portanto, a partir dessa rota de modificação química utilizando EDC, a Pct pode ser funcionalizada quimicamente com grupos tióis. Não obstante, uma vez que a reação de acoplamento ocorre somente nos grupos carboxílicos da Pct, a funcionalização é quimiosseletiva. A Pct funcionalizada com os grupos tióis foi denominada de Pct-SH e sua caracterização estrutural foi feita a partir das análises de FTIR e RMN de 1H , cujo espectros são apresentados na **Figura 17**.

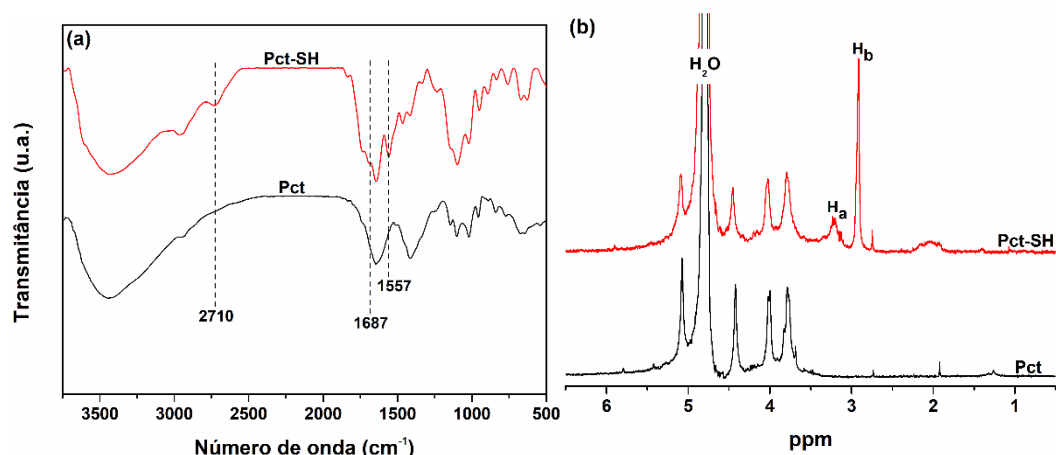


Figura 17. Espectros de FTIR (a) e RMN de ^1H (b) da Pct e Pct-SH.

Na **Figura 17a** é possível visualizar os espectros de FTIR da Pct e da Pct-SH. Comparando esses espectros, pode-se observar que a maioria das bandas características da Pct estão presentes no espectro da Pct-SH. Além disso, nota-se o aparecimento de novas bandas que apontam a modificação química da Pct com a L-cisteína. As principais bandas observadas nos espectros de FTIR desses polímeros e as suas atribuições estão descritas na **Tabela B.1** no **Apêndice B**. Especificamente, no espectro de FTIR da Pct-SH é possível verificar a presença de novas bandas em 2710 cm^{-1} , 1687 cm^{-1} e 1557 cm^{-1} que podem ser atribuídas, respectivamente, ao estiramento da ligação sulfidríla (S–H) dos grupos tióis, ao estiramento da carbonila (C=O) dos grupos carboxila da Cyst e ao estiramento da carbonila da ligação do tipo amida entre a Pct e a Cyst (HUAMANI-PALOMINO et al., 2019). A presença dessas bandas evidencia a funcionalização da Pct com os grupos tióis advindos da estrutura da Cyst. A **Figura 17b** mostra os espectros de RMN de ^1H da Pct e Pct-SH, e os principais sinais de ressonância e suas atribuições podem ser encontrados na **Tabela B.2** no **Apêndice B**. De maneira geral, o espectro de RMN de ^1H da Pct-SH apresenta a maioria dos sinais referentes aos prótons da estrutura sacarídica da Pct (na faixa de 5,00–3,65 ppm). Porém, dois novos sinais de ressonância em 3,20 e 2,90 ppm (assinalados como H_a e H_b na **Figura 17b**) podem ser notados no espectro da Pct-SH. Esses sinais são decorrentes dos hidrogênios da estrutura carbônica da Cyst. Logo, confirmando a modificação da Pct com esse aminoácido e a sua funcionalização com os grupos tióis (Carvalho et al., 2019).

A partir do espectro de RMN de ^1H da Pct-SH, o DS pode ser estimado utilizando a Eq. (9):

$$DS (\%) = \left(\frac{I_{Ha} + I_{Hb}/2}{I_{H2-H4}/3} \right) \times 100 \quad (9)$$

onde I_{Ha} e I_{Hb} são as áreas dos sinais de ressonância dos hidrogênios da L-cisteína (observados em 3,20 e 2,90 ppm, respectivamente), enquanto I_{H2-H4} é a área dos sinais correspondes aos hidrogênios da estrutura sacarídica da Pct-SH (presentes na região entre 4,10 e 3,65 ppm). As áreas desses sinais de ressonância foram obtidas por integração e, por meio da Eq. (9), o DS da Pct-SH foi estimado como 25%. Como demonstrado por CHEN *et al.* (2018) e LAFFLEUR *et al.* (2016), o uso da L-cisteína como agente de tiolação resulta em baixos valores de DS e tais resultados sugerem uma baixa reatividade desse aminoácido. De fato, maiores valores de DS ($> 0,4$) somente são obtidos quando outros tipos de agentes de tiolação são empregados como, por exemplo, o ácido tioglicólico ou o ácido 2-mercaptonicotínico (Chen *et al.*, 2015). Por fim, é importante mencionar que, além da incorporação da Cyst na estrutura da Pct ser quimiosseletiva, a oligomerização a partir do grupo tiol livre não é possível nas condições experimentais empregadas (Chen *et al.*, 2018).

A concentração de grupos tióis ($\mu\text{mol g}^{-1}$) na Pct-SH foi estimada por meio de um método espectrofotométrico utilizando DTNB (Fejerskov *et al.*, 2012). Na presença de grupos tióis, o DTNB é reduzido e, como resultado, um composto que absorve na região do UV-Vis é formado. Como a absorbância desse composto depende da sua concentração que, por sua vez, é diretamente proporcional a quantidade de grupos tióis, esse método pode ser utilizado para estimar a quantidade de grupos $-\text{SH}$ na Pct-SH. A partir desse método, a quantidade de grupos tióis na Pct-SH foi estimada como $600 \pm 30 \mu\text{mol g}^{-1}$.

4.3.2. Formação dos hidrogéis Pct-SH

Como mencionado anteriormente, o estudo apresentado neste Capítulo descreve a obtenção de um hidrogel preparado a partir da Pct funcionalizada com grupos tióis (Pct-SH) e formado por ligações dissulfeto. Para a formação dessas ligações foi utilizado uma nova rota de reticulação química, onde um oxidante foi empregado (persulfato de potássio, KPS). De fato, essa estratégia nunca foi usada no preparo de hidrogéis de Pct. Nessa abordagem, o KPS, quando submetido a altas temperaturas, decompõe-se e, dessa reação, são gerados diversos radicais livres no meio. Esses radicais abstraem o hidrogênio dos grupos tióis gerando radicais sulfidril ($-S^{\bullet}$) (Radi; Trujillo, 2016). Dessa forma, a partir da reação entre dois radicais sulfidril, as ligações dissulfeto são formadas e, concomitantemente, as cadeias poliméricas da Pct-SH são reticuladas umas às outras, obtendo-se o hidrogel. É importante mencionar que a possibilidade da formação de uma ligação S–O nas condições altamente oxidativas utilizadas não foi considerada nesse trabalho. Geralmente, a formação dessa ligação requer o uso de um catalisador metálico, uma condição que não é utilizada nesse trabalho (PENG *et al.*, 2020).

Portanto, a síntese do hidrogel é essencialmente baseada em um mecanismo radicalar e, dessa forma, as concentrações de Pct-SH e do KPS possuem uma grande influência no processo de gelificação. Portanto, o efeito da concentração da Pct-SH e do KPS no tempo de gelificação e na eficiência da gelificação foi investigado. Esse último parâmetro foi avaliado por meio do rendimento do processo de obtenção dos hidrogéis. Já o tempo de gelificação de cada formulação utilizada na síntese do hidrogel foi estimado visualmente usando o método de inversão do frasco. A **Figura 18** mostra os hidrogéis preparados em diferentes concentrações de Pct-SH e KPS. É importante mencionar que as soluções de Pct sofreram uma transição sol-gel somente na presença de KPS. Quando KPS é utilizado, todas as soluções gelificam, porém, em diferentes tempos. Como é possível verificar na **Figura 18**, o aumento da concentração de KPS e de Pct-SH diminuem o tempo de incubação (a 70 °C) necessário para a formação dos hidrogéis. Contudo, essa mesma correlação não foi verificada para a eficiência da gelificação, como observado na **Figura 19a**. Aparentemente, utilizando uma baixa quantidade de Pct-SH (5% m/m), o

processo de gelificação é pouco eficiente. Essa observação fica mais evidente quando a gelificação foi efetuada usando a menor quantidade de Pct-SH, mas variando a concentração de KPS. Nessa condição, o aumento da quantidade de KPS diminui a eficiência da gelificação. Esses resultados podem ser explicados pelo número limitado de grupos –SH na solução contendo a menor quantidade de Pct-SH. Dessa forma, a formação das ligações dissulfeto é reduzida devido à baixa disponibilidade de grupos –SH. Como resultado, as cadeias da Pct-SH não são reticuladas eficientemente (Cao, Yu *et al.*, 2019a). Além disso, quando a concentração de KPS aumenta, mas a de Pct-SH continua pequena, os radicais formados pela decomposição térmica do KPS possuem uma ação pouco seletiva, reagindo uns com os outros (Wang *et al.*, 2020). Esse efeito prejudica a formação das ligações dissulfeto. Ao contrário, com o aumento da concentração de Pct-SH, existe uma grande quantidade de grupos –SH disponíveis para reagir e a gelificação é mais eficiente (**Figura 19a**). Nesse caso, a maior concentração de KPS favorece o processo de gelificação, uma vez que mais radicais, advindos da decomposição térmica do KPS, são gerados. Esses radicais reagem com os diversos grupos –SH disponíveis e geram radicais sulfidril. Assim, os radicais sulfidril acoplam-se entre si e, como resultado, ligações dissulfeto são formadas e as cadeias de Pct-SH são reticuladas. Por fim, uma rede polimérica quimicamente reticulada é obtida.

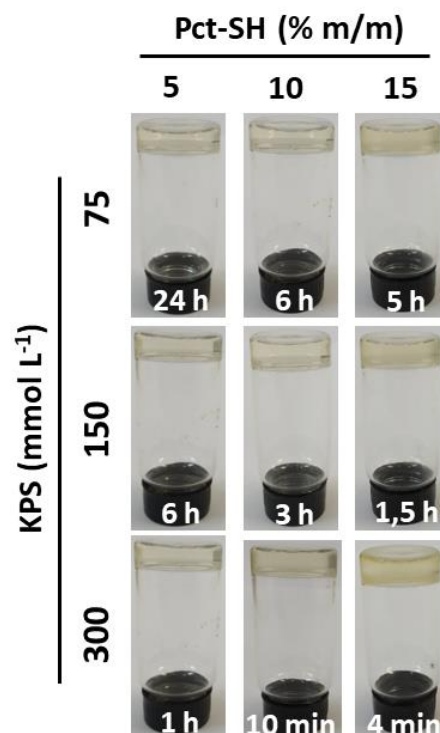


Figura 18. Tempos de gelificação das soluções de Pct-SH por meio do teste de inversão do tubo reacional. Os tempos de gelificação mostrados na Figura são valores médios ($n = 3$).

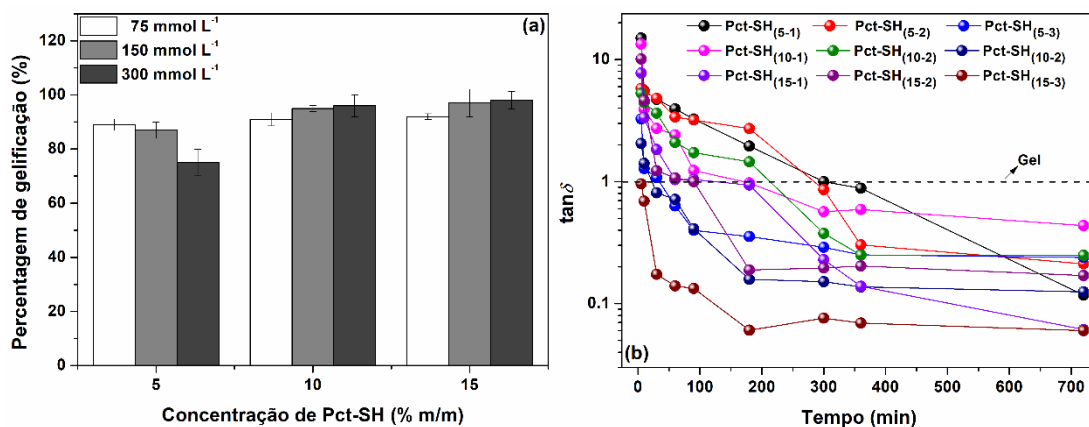


Figura 19. Percentual de gelificação (a) e $\tan \delta$ em função do tempo de reação (b) dos hidrogéis preparados em diferentes condições experimentais. $\tan \delta$ foi determinada na frequência de 1 Hz e os valores do desvio padrão não foram mostrados para facilitar a visualização dos resultados.

A cinética de gelificação das soluções de Pct-SH na presença de KPS foi investigada por análises reológicas dinâmicas utilizando um procedimento similar ao descrito no Capítulo 2 desta Tese, onde os valores de $\tan \delta$ (G''/G')

foram determinados em diferentes intervalos de tempo. Novamente, os valores de $\tan \delta$ foram obtidos na frequência de 1 Hz. O “ponto de gelificação” e o tempo de gelificação (t_{gel}) foram definidos quando o valor de $\tan \delta$ é 1 ($G'' = G'$). Os valores de $\tan \delta$ em função do tempo para cada formulação são mostrados na **Figura 19b**. As curvas de G' e G'' originais de cada formulação podem ser encontradas no **Apêndice B**. Como é possível verificar na **Figura 19b**, $\tan \delta$ progressivamente atinge o valor unitário ($\tan \delta \sim 1$), caracterizando a transição sol-gel e o ponto de gelificação das soluções de Pct-SH. Por meio dessas análises, t_{gel} foi identificado e os resultados sumarizados na **Tabela 4**. Como esperado, as análises reológicas e o teste de inversão do tubo reacional forneceram diferentes t_{gel} . Essa discrepância é decorrente da maior sensibilidade das análises reológicas frente às mudanças de viscosidade e do microambiente das soluções, logo, possuindo uma maior acurácia na determinação do ponto de gelificação e t_{gel} (SUN HAN CHANG et al., 2019). Apesar disso, todos os t_{gel} obtidos pelas análises reológicas apresentaram o mesmo comportamento observados nos testes de inversão do tubo reacional, onde maiores concentrações de Pct-SH e KPS resultaram em um processo de gelificação mais rápido. Por fim, cada hidrogel preparado apresentou um valor de $\tan \delta$ distinto ao final dos experimentos (**Figura 19b**). Esses resultados indicam que os hidrogéis sintetizados apresentam uma distinta organização estrutural interna, incluindo diferentes graus de reticulação. Para verificar essa hipótese, os valores de ν_e dos hidrogéis foram estimados e sumarizados na **Tabela 4**. Como observado, na maioria das condições experimentais em que os hidrogéis foram preparados, ν_e é maior quando uma maior concentração de Pct-SH e KPS é utilizada. A única exceção a essa tendência são os hidrogéis preparados com uma menor quantidade de Pct-SH (5% m/m), onde o aumento na quantidade de KPS na formulação dos hidrogéis resulta em um ν_e menor. Como discutido anteriormente, a limitada quantidade de grupos –SH disponíveis para formar os pontos de reticulação e a baixa seletividade dos radicais persulfato contribuem para os baixos valores de ν_e obtidos para os hidrogéis preparados nessas condições. Desta maneira, todos esses resultados indicam que o processo de gelificação é dependente das quantidades da Pct-SH e KPS. Em especial, o aumento nas quantidades do polissacarídeo funcionalizado (> 5% m/m) e KPS

nas formulações beneficiam o processo de reticulação e a formação das ligações dissulfeto entre as cadeias da Pct-SH.

Tabela 4. Tempos de gelificação e densidade de reticulação dos hidrogéis Pct-SH preparados.

Hidrogel	t_{gel} (min) ^a	Densidade de reticulação (ν_e) (mol m ⁻³) ^b
Pct-SH ₍₅₋₁₎	300 ± 16,00	69,01 ± 1,63
Pct-SH ₍₅₋₂₎	280 ± 20,00	64,70 ± 1,40
Pct-SH ₍₅₋₃₎	40 ± 3,40	60,00 ± 0,40
Pct-SH ₍₁₀₋₁₎	190 ± 1,30	74,30 ± 0,20
Pct-SH ₍₁₀₋₂₎	215 ± 76,00	76,00 ± 0,19
Pct-SH ₍₁₀₋₃₎	15 ± 5,00	76,80 ± 0,36
Pct-SH ₍₁₅₋₁₎	70 ± 8,00	76,92 ± 0,01
Pct-SH ₍₁₅₋₂₎	50 ± 10,00	80,10 ± 0,30
Pct-SH ₍₁₅₋₃₎	5 ± 2,00	82,01 ± 0,20

^a Valores aproximados determinados a partir das análises reológicas.

^b Estimado a partir dos experimentos de intumescimento (n = 5).

Com o intuito de adquirir mais informações sobre o mecanismo de gelificação das soluções de Pct-SH na presença de KPS, a natureza química dos hidrogéis preparados foi investigada pela técnica de FTIR. Como mencionado anteriormente, o processo de gelificação das soluções de Pct-SH é baseado na formação de ligações dissulfeto entre as cadeias poliméricas. No entanto, a análise de FTIR não pode comprovar eficientemente a presença de ligações dissulfeto (–S–S–) nos hidrogéis. Alternativamente, tendo em vista que a formação dessas ligações depende do consumo dos grupos tióis, a banda característica da ligação sulfidrina (S–H) sofrerá algum tipo de mudança em sua forma ou intensidade. Essa banda, por sua vez, pode ser identificada nos espectros de FTIR. A **Figura 20** mostra os espectros de FTIR dos hidrogéis obtidos usando soluções de Pct-SH com concentrações de 5% (**Figura 20a**), 10% (**Figura 20b**) e 15% m/m (**Figura 20c**) na presença de diferentes quantidades de KPS.

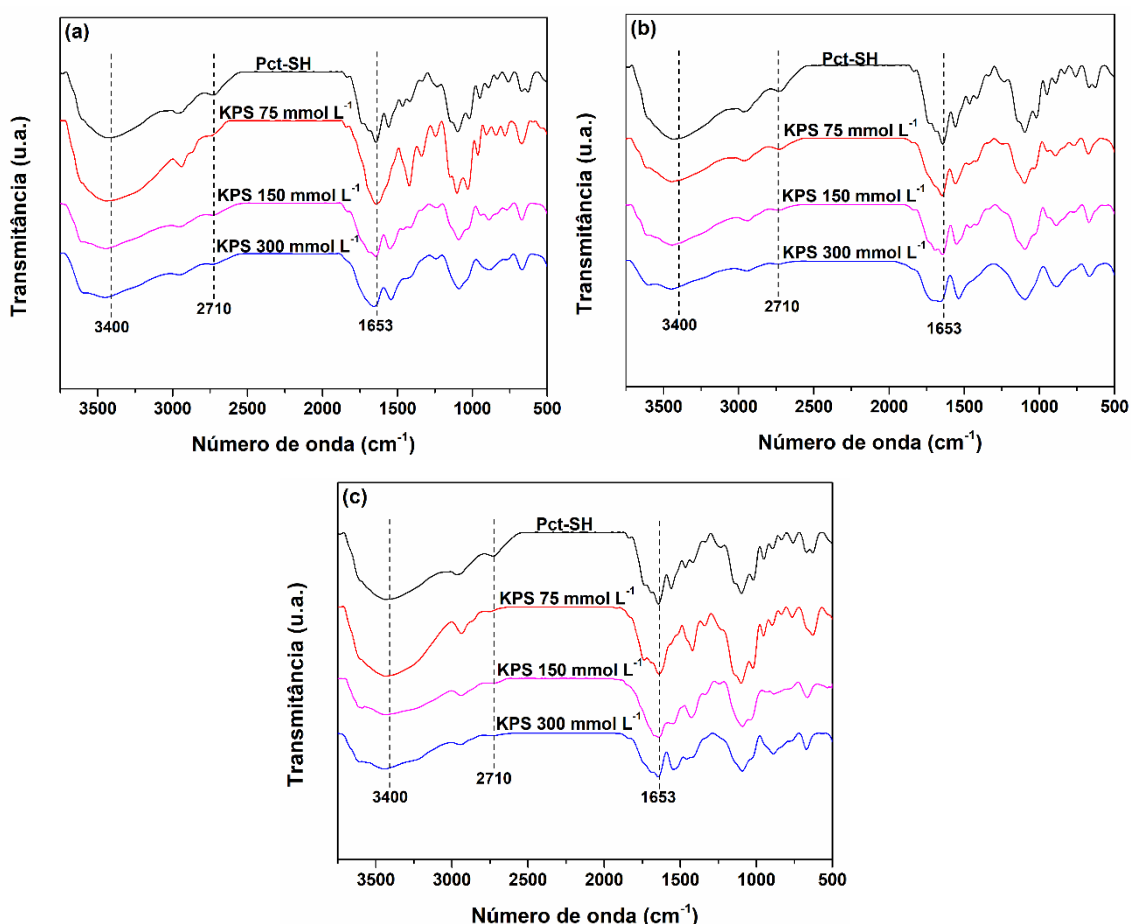


Figura 20. Espectros de FTIR dos hidrogéis obtidos a partir de soluções de Pct-SH com concentração de 5% (a), 10% (b) e 15% m/m (c) e diferentes quantidades de KPS.

Em geral, todos os espectros de FTIR dos hidrogéis apresentaram a maioria das bandas características da Pct-SH, logo, indicando que a estrutura do polissacarídeo não é afetada pelo processo de reticulação. Comparado ao espectro de FTIR da Pct-SH, a intensidade da banda associada ao estiramento da ligação S–H (em torno de 2710 cm^{-1}) diminuiu consideravelmente no espectro de todos os hidrogéis preparados, indicando o consumo dos grupos –SH por conta da formação das ligações dissulfeto. Portanto, os resultados das análises reológicas e espectroscópicas confirmam que a síntese dos hidrogéis é baseada na reticulação química da Pct-SH por conta da formação de ligações dissulfeto entre as cadeias desse polissacarídeo. Ainda, esses resultados demonstram que as quantidades de Pct-SH e KPS possuem uma grande influência na cinética e no processo de reticulação, sendo condizente com o mecanismo de reticulação radicalar proposto.

4.3.3. Caracterização dos hidrogéis Pct-SH

4.3.3.1. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos hidrogéis sintetizados foram investigadas por reologia e ensaios de compressão mecânica. Para as análises reológicas, os módulos G' e G'' foram analisados em função da oscilação da frequência, como mostrado na **Figura 21**. De acordo com esses experimentos, todos os hidrogéis sintetizados apresentaram um comportamento característico de géis, onde o módulo G' é maior que o módulo G'' em toda a faixa de frequências analisadas e nenhum ponto de intersecção entre as curvas pode ser notado (Wu, Xiaojun *et al.*, 2020). Apesar disso, em altas frequências (> 6 Hz), os valores de G' e G'' computados aumentam repentinamente (em diferentes intensidades) (**Figura 21**). Como mencionado anteriormente nesta Tese, os módulos G' e G'' estão relacionados, respectivamente, com o comportamento elástico e viscoso de uma amostra. Consequentemente, o aumento no valor desses módulos pode estar relacionado com uma mudança estrutural na rede polimérica dos hidrogéis em altas frequência. Em especial, o baixo tempo de relaxamento das cadeias poliméricas nessas condições contribui para o aumento do valor do módulo G' (Ganguly *et al.*, 2018). Em contrapartida, a concomitante elevação do módulo G'' é uma forte evidência de mudanças estruturais ocorrendo nos hidrogéis em altas frequências (Ganguly *et al.*, 2018). Nesse sentido, a densidade de reticulação é uma importante característica para a estabilidade estrutural dos hidrogéis sintetizados. Como observado na **Figura 21**, o aumento repentino de G' e G'' em altas frequências é menos notável nos hidrogéis Pct-SH₍₁₅₋₁₎, Pct-SH₍₁₅₋₂₎ e Pct-SH₍₁₅₋₃₎, os quais possuem uma elevada densidade de reticulação (**Tabela 4**). Consequentemente, a estrutura polimérica desses hidrogéis é capaz de suportar uma grande deformação em altas frequências sem sofrer danos. Assim, a maior estabilidade dos hidrogéis citados pode ter contribuído para o baixo aumento do módulo G'' em altas frequências.

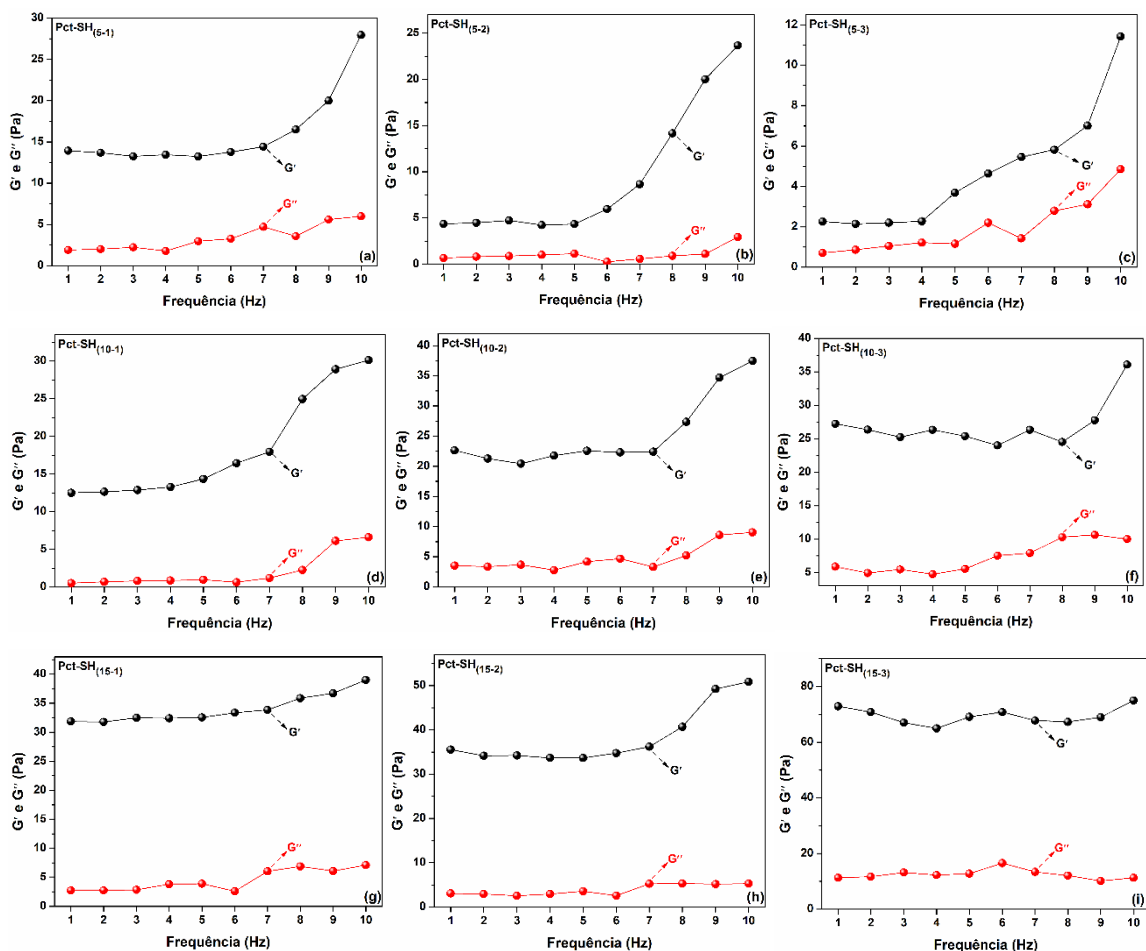


Figura 21. Módulos G' e G'' dos hidrogéis Pct-SH₍₅₋₁₎ (a), Pct-SH₍₅₋₂₎ (b), Pct-SH₍₅₋₃₎ (c), Pct-SH₍₁₀₋₁₎ (d), Pct-SH₍₁₀₋₂₎ (e), Pct-SH₍₁₀₋₃₎ (f), Pct-SH₍₁₅₋₁₎ (g), Pct-SH₍₁₅₋₂₎ (h) e Pct-SH₍₁₅₋₃₎ (i).

De maneira geral, os resultados descritos na **Figura 21** possuem uma estreita relação com o grau de reticulação dos hidrogéis sintetizados. Essa relação é evidente quando os valores de G' , na frequência de 1 Hz, são comparados. Através dessa comparação, descrita na **Tabela 5**, verifica-se que os valores de G' são maiores para os hidrogéis sintetizados com uma maior quantidade de Pct-SH e KPS. Excepcionalmente, nos hidrogéis preparados com a menor quantidade de Pct-SH, os valores de G' diminuem com o aumento de KPS utilizado na formulação. Portanto, os valores de G' aumentam progressivamente quanto maior a densidade de reticulação dos hidrogéis sintetizados (**Tabelas 4 e 5**). Essa constatação indica que as propriedades mecânicas dos hidrogéis podem ser otimizadas de acordo com as quantidades de Pct-SH e KPS utilizadas na síntese dos hidrogéis. De fato, ensaios de

compressão mecânica revelaram a relação entre a composição dos hidrogéis e suas propriedades mecânicas. Entre as várias propriedades mecânicas que podem ser obtidas, somente o módulo de Young e a deformação máxima no momento da ruptura (E) foram determinadas. O módulo de Young é determinado a partir da inclinação da porção linear da curva de tensão de compressão (em Pa) em função da deformação e está relacionado com a rigidez da amostra sendo analisada. Por sua vez, E é definida como a deformação em que ocorre uma queda brusca na tensão de compressão da amostra, caracterizando a sua ruptura. Esses parâmetros foram calculados a partir das curvas de tensão em função da deformação de cada hidrogel sintetizado e os valores são apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Propriedades mecânicas dos hidrogéis Pct-SH preparados.

Hidrogel	Propriedades mecânicas		
	G' (Pa) ^a	Módulo de Young (Pa) ^b	E (%) ^b
Pct-SH ₍₅₋₁₎	14,00 ± 4,21	10,21 ± 3,41	23,00 ± 2,00
Pct-SH ₍₅₋₂₎	4,50 ± 2,00	8,00 ± 2,00	12,50 ± 1,31
Pct-SH ₍₅₋₃₎	2,30 ± 0,81	7,71 ± 1,90	12,41 ± 2,00
Pct-SH ₍₁₀₋₁₎	12,58 ± 1,88	14,00 ± 3,00	26,00 ± 2,54
Pct-SH ₍₁₀₋₂₎	22,76 ± 2,79	24,09 ± 4,71	30,00 ± 3,00
Pct-SH ₍₁₀₋₃₎	27,31 ± 0,76	27,00 ± 5,00	32,60 ± 5,00
Pct-SH ₍₁₅₋₁₎	32,14 ± 3,00	28,83 ± 3,00	34,00 ± 0,87
Pct-SH ₍₁₅₋₂₎	35,64 ± 4,89	30,00 ± 9,00	35,40 ± 1,00
Pct-SH ₍₁₅₋₃₎	74,00 ± 5,00	30,08 ± 4,20	36,80 ± 6,12

^a Valores médios de três replicatas (n = 3).

^b Propriedades determinadas pelas análises de compressão mecânica (n = 3).

Analisando os dados apresentados na **Tabela 5**, verifica-se que os maiores valores do Módulo de Young e de E foram verificados para os hidrogéis possuindo uma maior densidade de reticulação. Esses hidrogéis possuem uma rede polimérica densamente reticulada e mecanicamente estável frente a uma força de deformação. Dessa maneira, a ruptura da rede polimérica nesses hidrogéis ocorre somente com uma grande deformação (ou seja, um maior valor de E). Como é possível observar na **Tabela 5**, os hidrogéis preparados com a menor quantidade de Pct-SH possuem os menores valores calculados para o

Módulo de Young e E , já que a densidade de reticulação desses materiais é baixa. Consequentemente, a rede polimérica dos hidrogéis preparados com a menor quantidade de Pct-SH é menos rígida e facilmente deformada.

4.3.3.2. Intumescimento e degradação

Como mencionado anteriormente nesta Tese, o intumescimento e absorção de líquido são importantes características de hidrogéis com potencial aplicação biomédica. Desta forma, o intumescimento máximo dos hidrogéis Pct-SH foi investigado em PBS (pH 7,4). Esses experimentos foram conduzidos na temperatura constante de 37 °C e os resultados são mostrados na **Figura 22**. Como observado, os hidrogéis preparados com uma maior concentração de Pct-SH e KPS apresentaram um menor intumescimento máximo. Entretanto, essa tendência não foi observada para os hidrogéis preparados com a menor concentração de Pct-SH (5% m/m), onde o aumento na concentração de KPS nas formulações resultou em um aumento no intumescimento máximo. Em geral, esses resultados podem ser explicados considerando a densidade de reticulação dos hidrogéis preparados (**Tabela 4**). Hidrogéis preparados com uma maior concentração de Pct-SH e KPS possuem uma maior densidade de reticulação e, como consequência, a expansão da matriz polimérica desses materiais é restrita e a absorção de líquido é limitada (FAJARDO *et al.*, 2012). Em contraste, os materiais com uma menor densidade de reticulação possuem uma matriz polimérica com maior mobilidade devido ao baixo número de pontos de reticulação, facilitando a sua expansão e maior absorção de líquido (FAJARDO *et al.*, 2012).

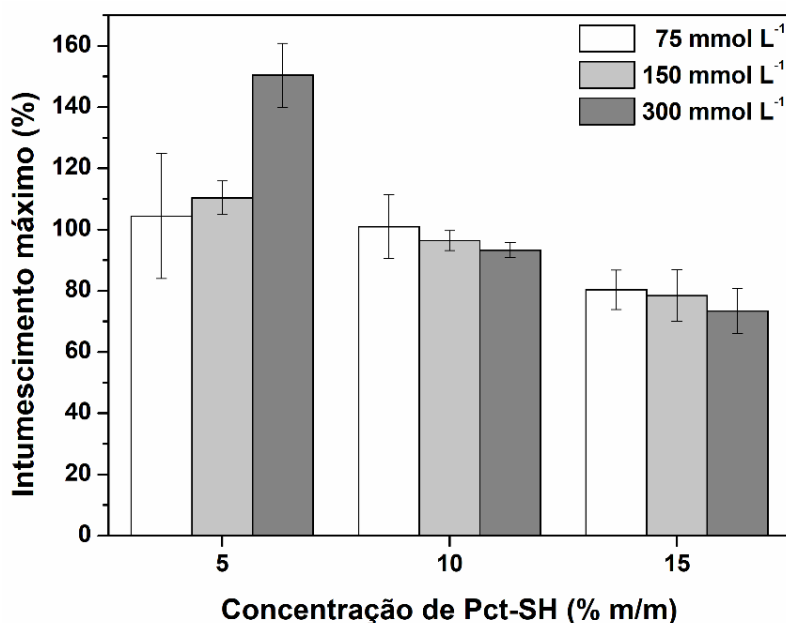


Figura 22. Intumescimento máximo dos hidrogéis Pct-SH preparados em meio PBS (pH 7,4) na temperatura constante de 37 °C.

O perfil de degradação dos hidrogéis Pct-SH preparados também foi investigado. Uma vez que esses materiais são reticulados por ligações dissulfeto, o perfil de degradação dos hidrogéis deve ser acelerado na presença de agentes redutores, tornando-os materiais responsivos. Para investigar essa hipótese, a perda de massa dos hidrogéis Pct-SH foi analisada em PBS (pH 7,4, 37 °C) na ausência e presença de agentes redutores fisiológicos. Neste estudo, os agentes redutores utilizados foram a glutathiona reduzida (GSH) e a L-cisteína (Cyst), já que essas moléculas redutoras são produzidas pelo corpo humano e podem ser encontradas no meio extracelular (Cao, Zhiwen *et al.*, 2019; Lin; Battistoni; Liu, 2021). Entretanto, a perda de massa dos hidrogéis foi investigada primeiramente em PBS na ausência dos agentes redutores. Os resultados desses experimentos são mostrados na **Figura 23**. Todos os hidrogéis preparados apresentaram uma perda de massa de, no máximo, 30%, mesmo após vários dias após o início dos experimentos. Essa tendência revela que os hidrogéis Pct-SH possuem uma grande estabilidade nessas condições experimentais. Apesar da aparente estabilidade, a pequena perda de massa observada em PBS para esses materiais apresenta uma estreita relação com a densidade de reticulação. Em geral, os hidrogéis mais densamente reticulados

apresentaram uma menor perda de massa. De fato, a maior perda de massa observada (aproximadamente 30%) foi observada para o hidrogel Pct-SH₍₅₋₃₎, o qual possui a menor densidade de reticulação entre os hidrogéis preparados (Tabela 4).

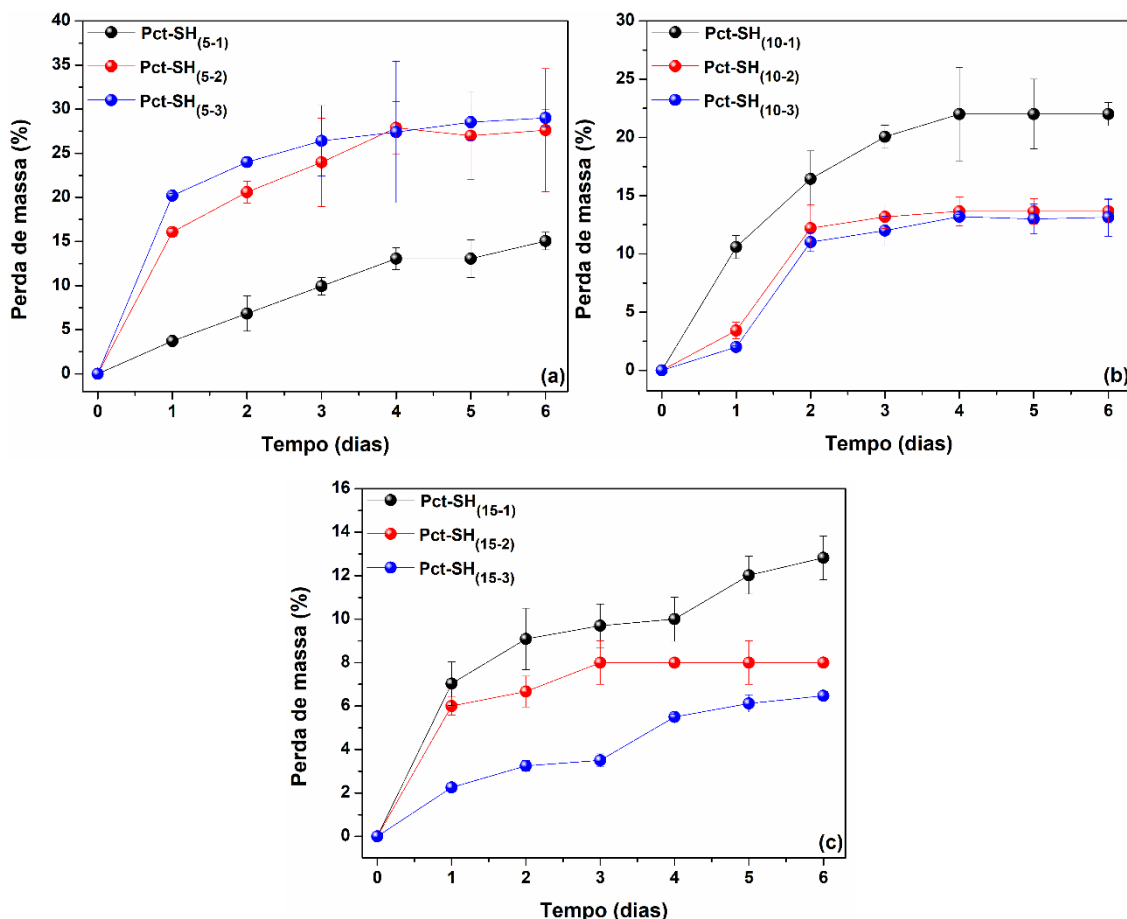


Figura 23. Curvas da perda de massa dos hidrogéis Pct-SH preparados com diferentes concentrações de Pct-SH de 5 % m/m (a), 10 % m/m (b) e 15 % m/m (c) em meio PBS (pH 7,4) na temperatura de 37 °C.

Em contrapartida, os hidrogéis incubados em PBS contendo os agentes redutores GSH (**Figura 24**) e Cyst (**Figura 25**) apresentaram uma rápida perda de massa. Como observado, o tempo necessário para promover a erosão (ou seja, perda de massa) desses materiais foi reduzida de dias para apenas alguns minutos. A rápida e elevada perda de massa dos hidrogéis na presença de GSH e Cyst é um resultado direto da quebra das ligações dissulfeto entre as cadeias

poliméricas nessas condições experimentais, logo, induzindo a erosão da matriz polimérica e dos hidrogéis. De fato, todos os hidrogéis preparados perderam mais da metade da sua massa inicial ao fim dos experimentos.

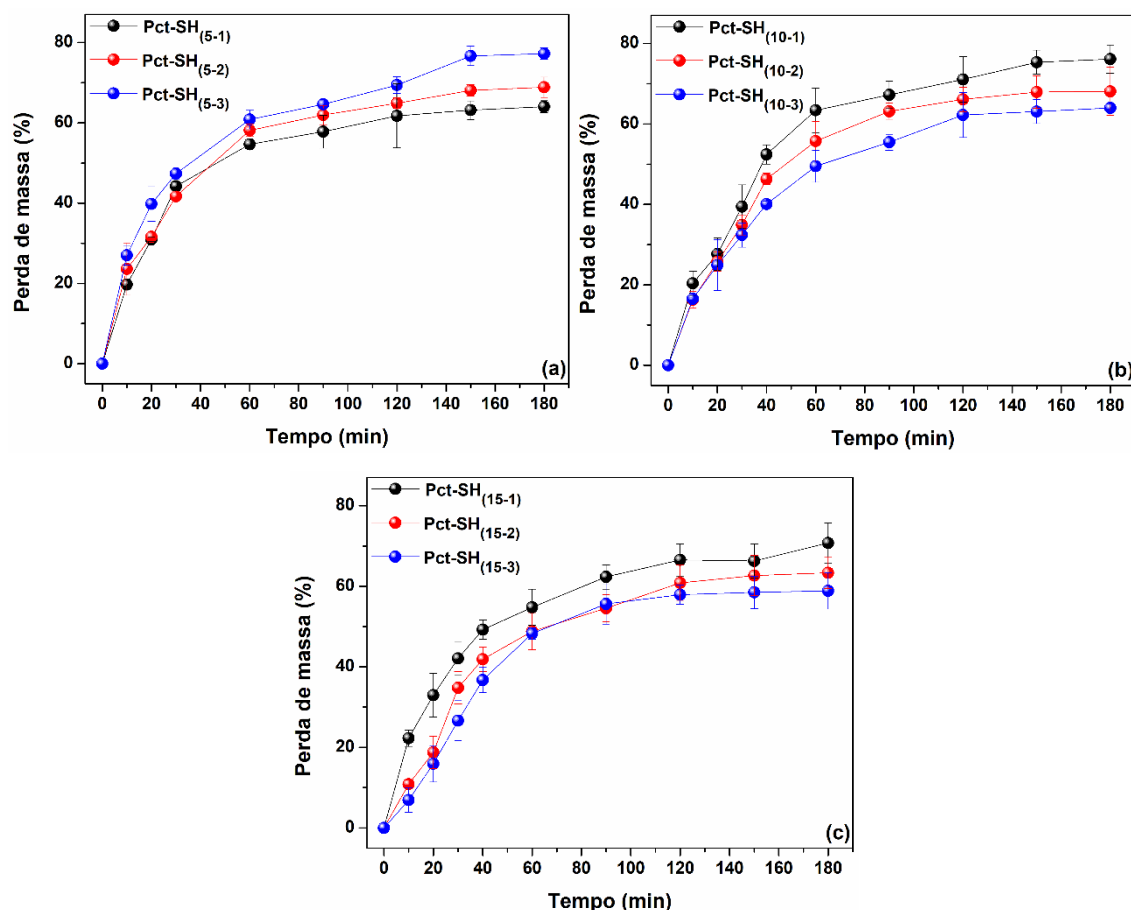


Figura 24. Curvas da perda de massa dos hidrogéis Pct-SH preparados com diferentes concentrações de Pct-SH de 5 % m/m (a), 10 % m/m (b) e 15 % m/m (c) em meio PBS (pH 7,4) suplementado com GSH (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$.

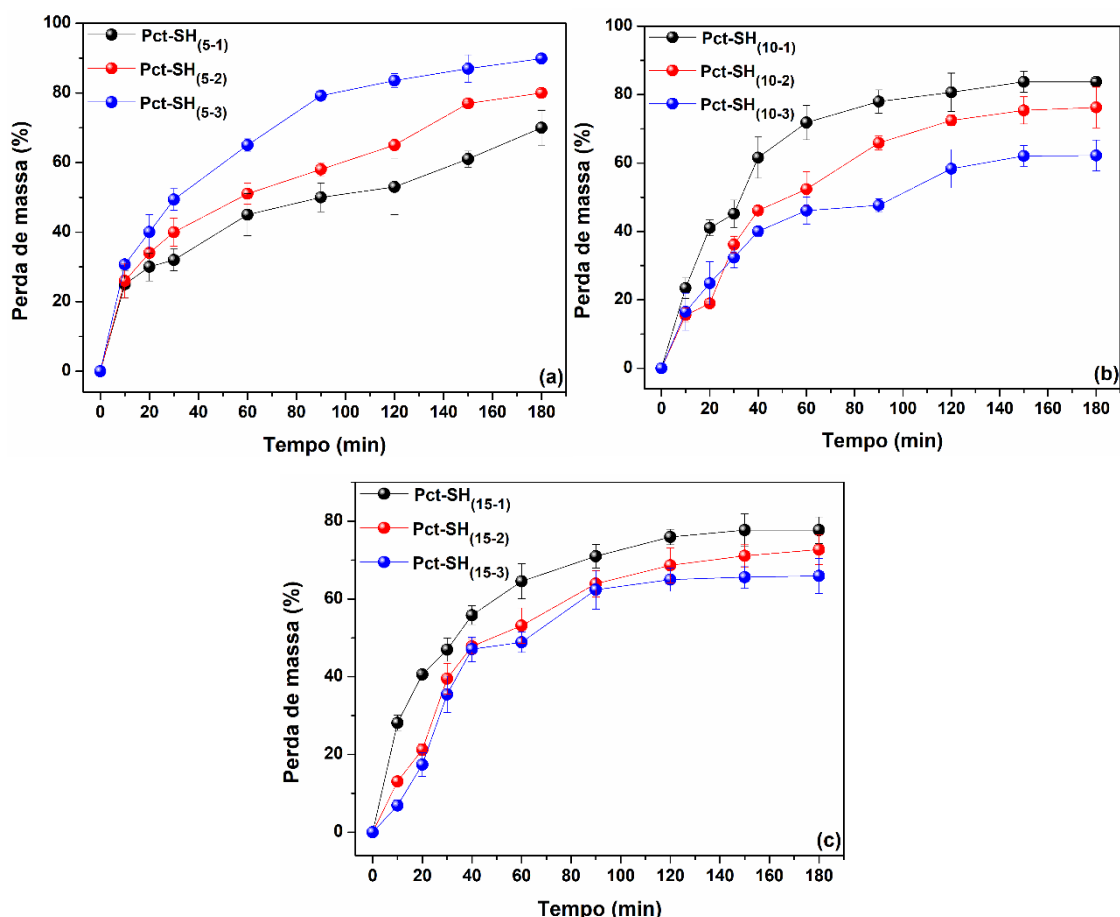


Figura 25. Curvas da perda de massa dos hidrogéis Pct-SH preparados com diferentes concentrações de Pct-SH de 5 % m/m (a), 10 % m/m (b) e 15 % m/m (c) em meio PBS (pH 7,4) suplementado com Cyst (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$.

Os experimentos na presença dos agentes redutores também revelaram que o perfil e a taxa de perda de massa dos hidrogéis nessas condições também são dependentes da densidade de reticulação desses materiais. Novamente, longos tempos de incubação foram necessários para degradar os hidrogéis com maior densidade de reticulação. Por exemplo, o hidrogel Pct-SH₍₁₅₋₃₎, o material preparado com a maior densidade de reticulação, perdeu metade da sua massa inicial somente após 90 min de incubação no meio contendo os agentes redutores. Nesse mesmo período, o hidrogel Pct-SH₍₅₋₃₎, com a menor densidade de reticulação, perdeu quase toda sua massa inicial (aproximadamente, 94% de perda de massa). As discrepâncias entre os perfis de perda de massa dos hidrogéis Pct-SH nas diferentes condições experimentais testadas (com e sem os agentes redutores) são evidentes por meio da análise das suas constantes

de degradação (k_d). De maneira geral, a degradação dos hidrogéis Pct-SH pode ser tratada como um processo cinético de primeira-ordem (Zhang, Mengdi *et al.*, 2020). Portanto, utilizando esse modelo, a cinética da perda de massa dos hidrogéis foi analisada (Zhang, Mengdi *et al.*, 2020). As constantes k_d calculadas estão sumarizadas na **Tabela 6** para cada condição experimental testada.

Tabela 6. Constantes cinéticas da degradação dos hidrogéis Pct-SH preparados em diferentes condições experimentais.

Hidrogel	k_d		
	PBS ^a	PBS + GSH ^b	PBS + Cyst ^b
Pct-SH ₍₅₋₁₎	0,034	0,006	0,007
Pct-SH ₍₅₋₂₎	0,070	0,008	0,008
Pct-SH ₍₅₋₃₎	0,072	0,009	0,010
Pct-SH ₍₁₀₋₁₎	0,609	0,010	0,020
Pct-SH ₍₁₀₋₂₎	0,424	0,014	0,010
Pct-SH ₍₁₀₋₃₎	0,405	0,008	0,009
Pct-SH ₍₁₅₋₁₎	0,030	0,009	0,010
Pct-SH ₍₁₅₋₂₎	0,018	0,007	0,007
Pct-SH ₍₁₅₋₃₎	0,012	0,006	0,007

^a k_d em dias⁻¹.

^b k_d em min⁻¹.

De acordo com os dados apresentados na **Tabela 6**, as constantes k_d possuem uma relação inversa com a densidade de reticulação dos hidrogéis (**Tabela 4** para consulta aos valores da densidade de reticulação dos hidrogéis). Sucintamente, uma maior densidade de reticulação acarreta um menor valor de k_d . Logo, a perda de massa e degradação dos hidrogéis é mais lenta e menos eficiente com o aumento da densidade de reticulação dos materiais. Provavelmente, a difusão dos agentes redutores na matriz polimérica dos hidrogéis é prejudicada com o aumento da densidade de reticulação (Zhang *et al.*, 2021). Como resultado, a penetração de GSH e Cyst na matriz polimérica é limitada e longos tempos de incubação são necessários para promover a degradação dos hidrogéis Pct-SH mais reticulados. A análise dos dados da **Tabela 6** também revelam a influência do tipo de agente redutor na degradação dos hidrogéis. Comparando os valores de k_d , a perda de massa dos hidrogéis é

mais rápida na presença de Cyst em comparação com a GSH. Basicamente, essa diferença está relacionada com a facilidade de penetração e difusão dos agentes redutores na matriz polimérica dos hidrogéis (CHOH; CROSS; WANG, 2011). Por conta do baixo peso molecular da Cyst (121 Da) em comparação com a GSH (307 Da), esse aminoácido possui uma maior facilidade em penetrar a matriz do hidrogéis e promover a redução e quebra das ligações dissulfeto entre as cadeias poliméricas, logo, resultando na degradação dos hidrogéis. Apesar dessas diferenças, todos os hidrogéis Pct-SH preparados apresentaram uma maior degradação na presença de GSH e Cyst. Esses resultados indicam que a degradação desses materiais pode ser manipulada por meio do controle do ambiente redox (isto é, presença ou ausência de agentes redutores fisiológicos). Estudos na literatura indicam uma maior concentração de GSH e Cyst em regiões tumorais e inflamadas (CAO, Z. et al., 2019; CHOH; CROSS; WANG, 2011). Dessa forma, o comportamento responsivo dos hidrogéis Pct-SH pode ser muito útil para promover e controlar a liberação de fármacos encapsulados nessas condições.

4.3.3.3. Injetabilidade e capacidade *self-healing*

Hidrogéis injetáveis são muito atrativos como potenciais sistemas de liberação controlada, uma vez que esses materiais podem ser aplicados em um local de interesse clínico no corpo humano e promover a liberação de uma droga encapsulada diretamente em um tumor ou região inflamada (Pertici *et al.*, 2019). Essa característica previne (ou ao menos reduz) a perda sistêmica do composto bioativo do local de ação, prolongando o seu efeito (Pertici *et al.*, 2019). Dessa forma, para testar a injetabilidade dos hidrogéis Pct-SH, experimentos de extrusão foram realizados (SUN; HUANG, 2016). Neste Capítulo, injetabilidade é definida como a capacidade de um material em passar por uma agulha sem promover o seu entupimento. Portanto, para os experimentos de extrusão, os hidrogéis foram alocados dentro de uma seringa, sendo pressionados pelo êmbolo da seringa, forçando a extrusão dos géis através da agulha 18G, como mostrado na **Figura 26a**. De acordo com os resultados desses experimentos, os hidrogéis que possuem uma maior densidade de reticulação apresentaram uma injetabilidade limitada e promoveram o entupimento da agulha. Esse

comportamento foi observado para os hidrogéis Pct-SH₍₁₀₋₁₎, Pct-SH₍₁₀₋₂₎ e Pct-SH₍₁₀₋₃₎, Pct-SH₍₁₅₋₁₎, Pct-SH₍₁₅₋₂₎ e Pct-SH₍₁₅₋₃₎. Devido a elevada densidade de reticulação desses materiais, as suas cadeias poliméricas possuem uma baixa mobilidade e, como consequência, o processo de extrusão desses hidrogéis é prejudicado. Em oposição, os hidrogéis Pct-SH₍₅₋₁₎, Pct-SH₍₅₋₂₎ e Pct-SH₍₅₋₃₎, que possuem uma menor densidade de reticulação e, portanto, uma maior flexibilidade das cadeias poliméricas, foram facilmente injetados e nenhum sinal de entupimento da agulha foi observado. Além disso, após 2 h em repouso à temperatura ambiente, os fragmentos dos hidrogéis gradualmente recuperam a sua forma antes da extrusão, indicando a sua habilidade de autorreparo, amplamente conhecida como *self-healing*. De maneira geral, o *self-healing* observado nos hidrogéis preparados pode estar relacionado com a presença de grupos –SH livres, como indicado nos espectros de FTIR. Após o processo de extrusão dos hidrogéis, esses grupos podem atacar uma ligação dissulfeto próxima, formando uma nova ligação do mesmo tipo (CAO, Y. et al., 2019). Esse processo de troca é ilustrado na **Figura 26b** e tem como principal consequência a indução da reorganização da matriz polimérica, que, por sua vez, promove o *self-healing* dos hidrogéis Pct-SH (CAO, Y. et al., 2019; SUN; HUANG, 2016).

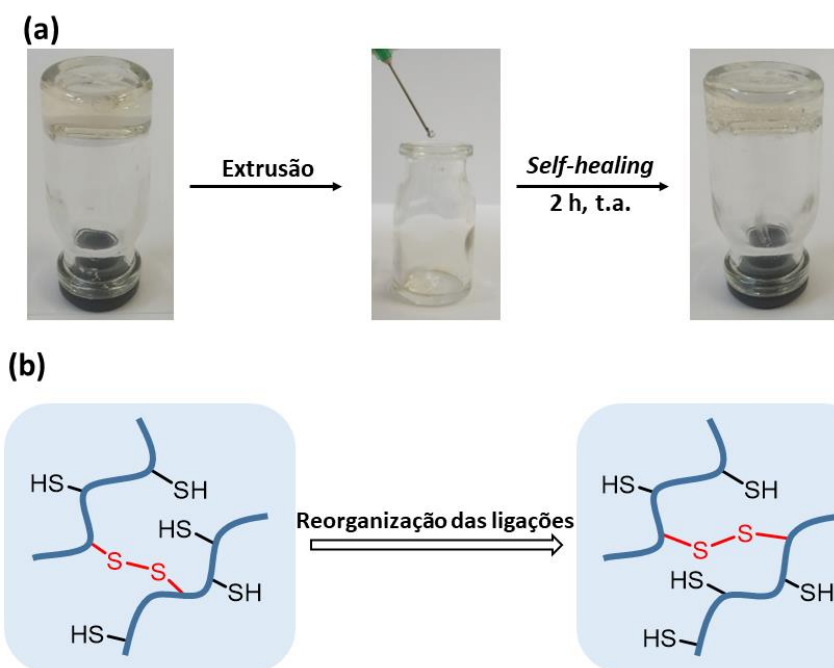


Figura 26. Experimento de extrusão realizado para investigar a injetabilidade dos hidrogéis Pct-SH (a) e o mecanismo proposto para o processo de *self-healing* observado nos hidrogéis (b).

Com o intuito de obter mais informações sobre o processo de *self-healing*, a natureza química dos hidrogéis “autorreparados” foi investigada por análises de FTIR. Essas análises foram conduzidas para os hidrogéis Pct-SH₍₅₋₁₎, Pct-SH₍₅₋₂₎ e Pct-SH₍₅₋₃₎, já que somente esses materiais apresentaram *self-healing*. Os espectros de FTIR obtidos são apresentados na **Figura 27**. Como observado, os espectros desses materiais são similares aos espectros dos hidrogéis originais (antes da extrusão e *self-healing*). Apesar disso, algumas diferenças podem ser observadas. Por exemplo, a banda assinalada ao estiramento O–H foi levemente afinada e as bandas associadas aos grupos carboxílicos da Pct e da porção incorporada da Cyst foram levemente alargadas (**Figura 27**). Todas essas mudanças indicam a presença de fortes ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas na matriz dos hidrogéis “autorreparados” (UMAN; DHAND; BURDICK, 2020). Provavelmente, a reorganização das ligações dissulfeto na matriz polimérica favorece a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas. Dessa forma, tais ligações de hidrogênio atuam como uma força auxiliar para estabilizar a matriz polimérica e facilitar o processo de “autorreparação” dos hidrogéis Pct-SH (UMAN; DHAND; BURDICK, 2020). Além

disso, a análise dos espectros de FTIR dos hidrogéis reparados indica que a banda associada aos grupos –SH mudou significativamente após o processo de “autorreparação”, haja visto que o número total de ligações dissulfeto não é alterado; as ligações dissulfeto são apenas reorganizadas (SUN; HUANG, 2016). Todos esses resultados confirmam que o processo de “autorreparação” dos hidrogéis Pct-SH está relacionado a reorganização das ligações dissulfeto.

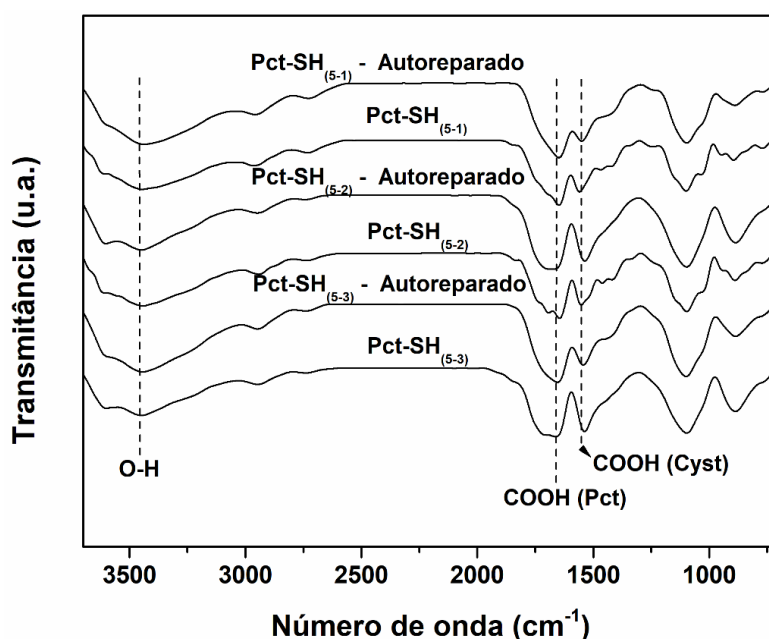


Figura 27. Espectros de FTIR dos hidrogéis Pct-SH₍₅₋₁₎, Pct-SH₍₅₋₂₎ e Pct-SH₍₅₋₃₎ antes e depois do processo de “autorreparação”.

Apesar da habilidade autorregenerativa dos hidrogéis Pct-SH, os materiais regenerados podem apresentar propriedades mecânicas inferiores em comparação a sua “forma original”. Para investigar essa possibilidade, o módulo de Young dos hidrogéis antes e depois do processo de extrusão e autorreparação foi calculado e os valores obtidos são mostrados na **Figura 28**. É importante mencionar que essas análises foram realizadas com os hidrogéis preparados com a menor quantidade de Pct-SH, isto é, hidrogéis Pct-SH₍₅₋₁₎, Pct-SH₍₅₋₂₎ e Pct-SH₍₅₋₃₎, já que somente esses materiais são injetáveis. Como observado na **Figura 28**, o módulo de Young dos hidrogéis autorreparados diminuiu em comparação com aqueles não submetidos ao processo de extrusão.

Apesar disso, a análise dos dados apresentados na **Figura 28** revelam uma tendência: uma menor densidade de reticulação resulta em módulos de Young mais próximos entre os hidrogéis antes e depois do processo de autorregeneração. De maneira geral, uma menor densidade de reticulação indica uma maior quantidade de grupos –SH livres para reagir com as ligações dissulfeto e promover a reorganização e autorregeneração dos hidrogéis. Todos os resultados obtidos sugerem que os hidrogéis Pct-SH preparados podem atuar como um biomaterial injetável.

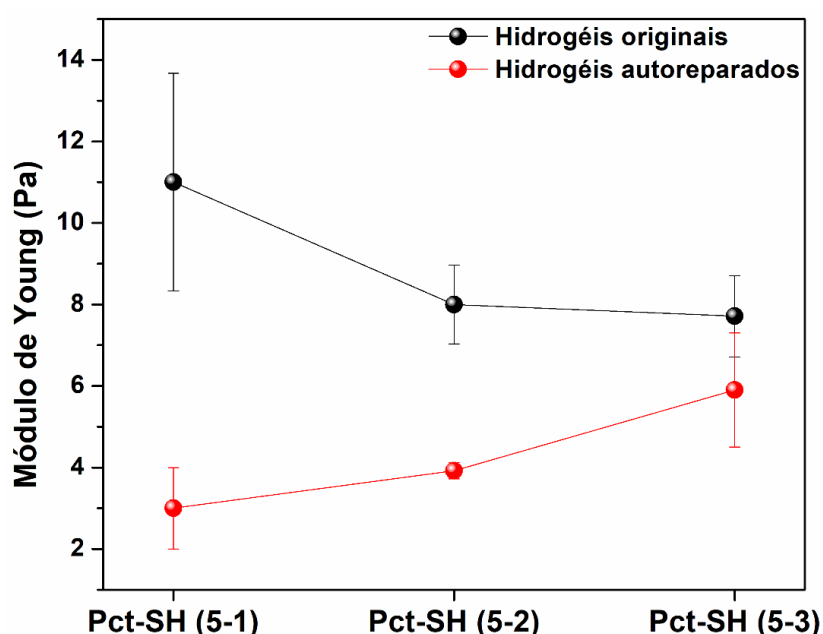


Figura 28. Módulos de Young dos hidrogéis antes e após o processo de extrusão pela seringa.

4.3.4. Liberação controlada de acetaminofeno (ACT)

Para avaliar o potencial uso dos hidrogéis Pct-SH como dispositivos de liberação controlada de fármacos, acetaminofeno (ACT) foi encapsulado e a sua liberação dos hidrogéis carregados foi avaliada. Neste trabalho, ACT foi usado como droga padrão por conta de seu amplo uso como analgésico no tratamento de dores agudas provenientes de ferimentos (inflamados ou não) e cólicas menstruais (Tan; Ebrahimi; Langrish, 2019). Entretanto, a administração e ingestão de altas doses de ACT pode ocasionar diversos efeitos colaterais indesejados, como, por exemplo, náuseas, dor de cabeça e falência renal (Tan;

Ebrahimi; Langrish, 2019). Nesse sentido, o uso de hidrogéis como sistemas de liberação controlada de ACT é uma interessante alternativa para contornar essas desvantagens. Assim, a liberação de ACT dos hidrogéis carregados foi avaliada em PBS (pH 7,4) na temperatura constante de 37 °C. Além disso, o efeito dos agentes redutores GSH e Cyst na liberação também foi investigado. Os resultados dos experimentos em PBS são mostrados na **Figura 29**. As curvas de liberação de ACT dos hidrogéis em PBS contendo GSH e Cyst são apresentadas na **Figuras 30** e **Figura 31**, respectivamente.

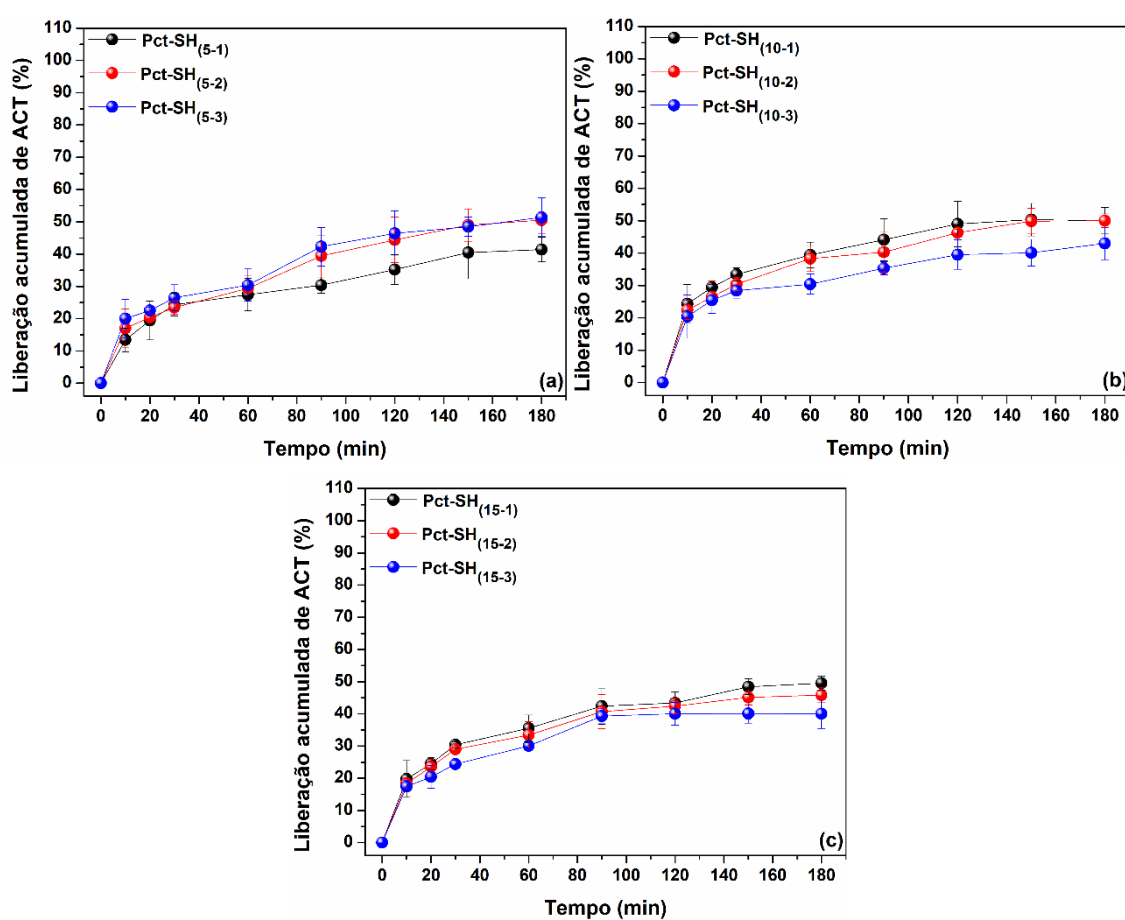


Figura 29. Curvas liberação de ACT dos hidrogéis Pct-SH preparados com diferentes concentrações de Pct-SH de 5 % m/m (a), 10 % m/m (b) e 15 % m/m (c) em meio PBS (pH 7,4) na temperatura de 37 °C.

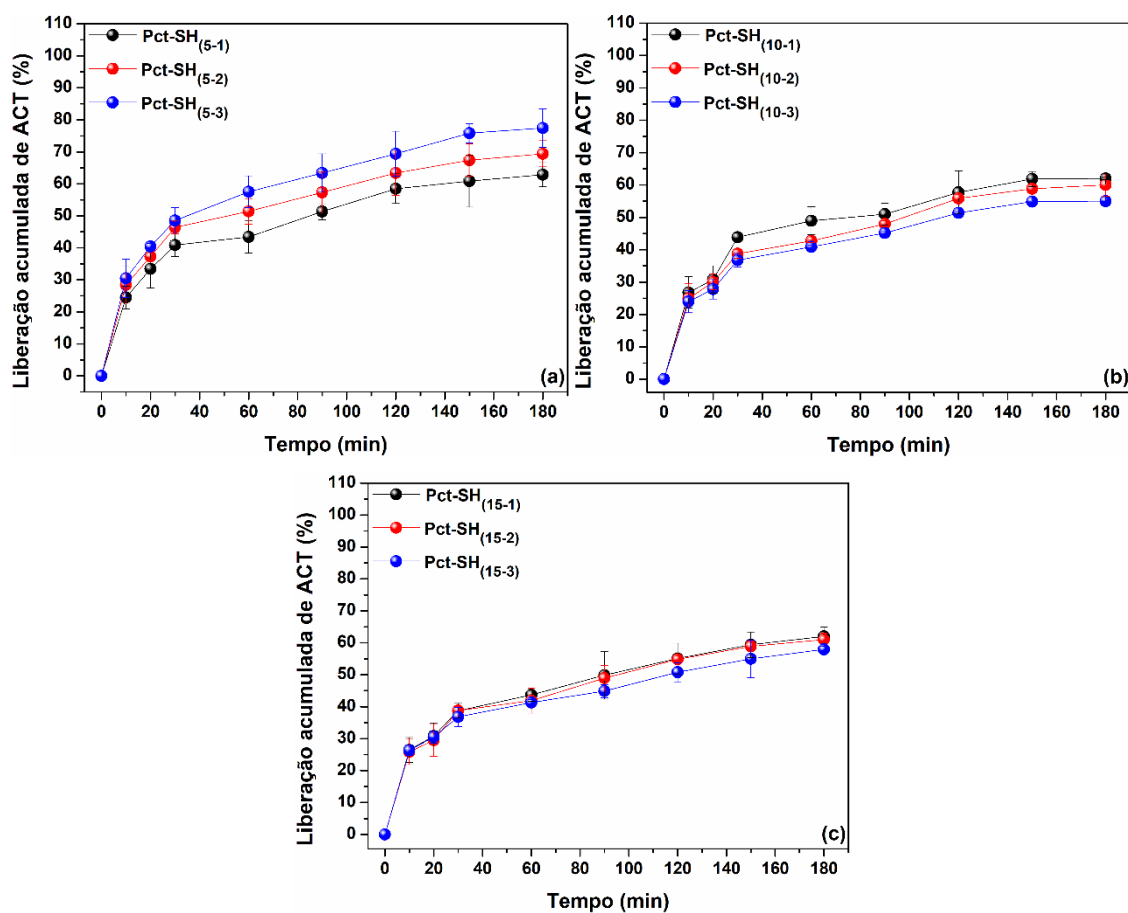


Figura 30. Curvas da liberação de ACT dos hidrogéis Pct-SH preparados com diferentes concentrações de Pct-SH de 5 % m/m (a), 10 % m/m (b) e 15 % m/m (c) em meio PBS (pH 7,4) suplementado com GSH (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$.

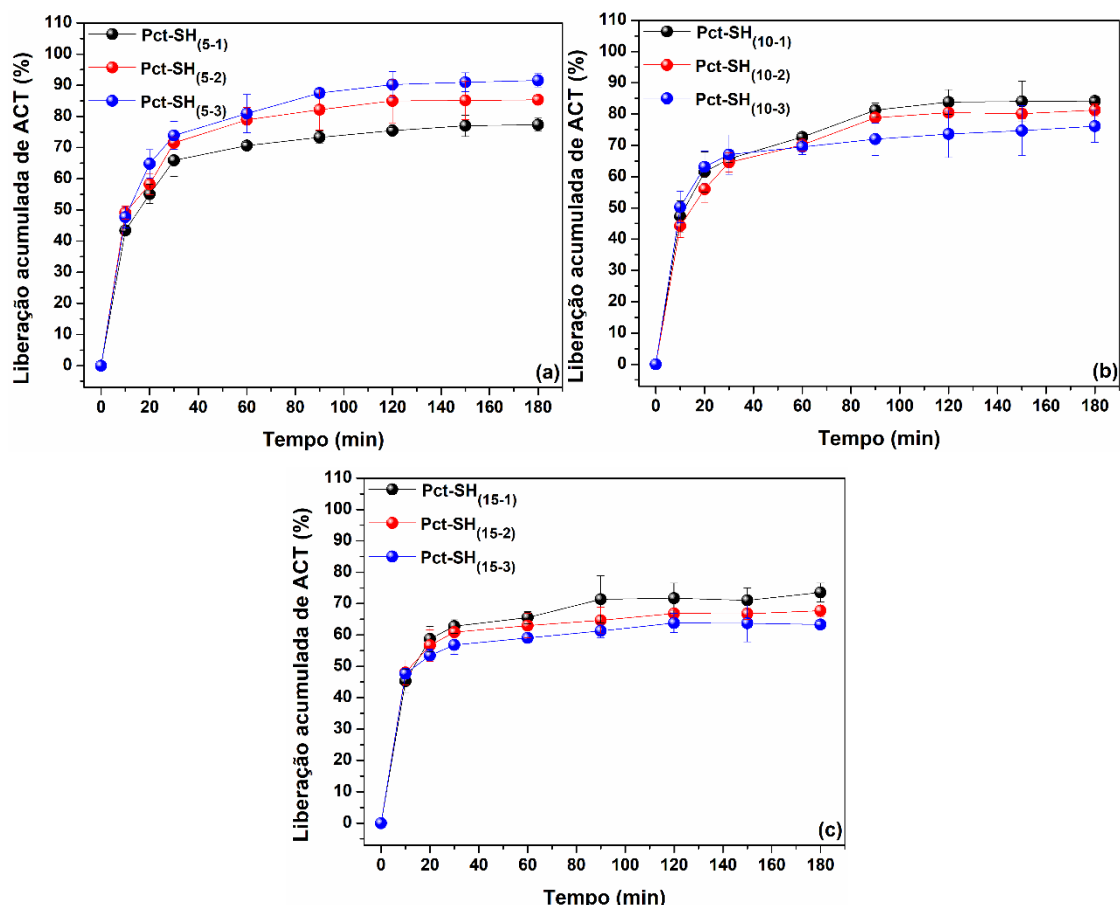


Figura 31. Curvas da liberação de ACT dos hidrogéis Pct-SH preparados com diferentes concentrações de Pct-SH de 5 % m/m (a), 10 % m/m (b) e 15 % m/m (c) em meio PBS (pH 7,4) suplementado com Cyst ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) na temperatura de 37°C .

Como é possível verificar, o perfil de liberação de ACT dos hidrogéis Pct-SH é similar em todas as condições experimentais testadas (com e sem agentes redutores). A similaridade entre os perfis de liberação está relacionada com o mecanismo geral de liberação de fármacos de materiais poliméricos (Peers; Montembault; Ladavière, 2020). Em geral, o processo de liberação começa com a absorção de líquido pelo material e, como consequência, a matriz polimérica intumescce e expande, facilitando a difusão do fármaco encapsulado para o meio (Peers; Montembault; Ladavière, 2020). Com o passar do tempo, o processo de liberação atinge um equilíbrio entre as moléculas de fármaco remanescentes no material e as moléculas livres no meio, onde a liberação desacelera e, eventualmente, cessa (Peers; Montembault; Ladavière, 2020). Obviamente, a degradação do hidrogel Pct-SH durante esse processo acelera a liberação de

ACT, já que o fármaco possui mais contato com o meio nessa condição (CAO, Y. *et al.*, 2019). De fato, o efeito da degradação do hidrogel é evidente quando os perfis de liberação de ACT na ausência e presença de GSH e Cyst são comparados, principalmente, nos instantes iniciais dos experimentos. Por exemplo, após 1 h, menos de 20% da quantidade de ACT encapsulado foi liberado dos hidrogéis incubados somente em PBS. Nesse mesmo intervalo, mais de 43% do fármaco foi liberado dos hidrogéis incubados no meio contendo GSH ou Cyst. Como especulado, a maior liberação de ACT dos hidrogéis na presença dos agentes redutores está associada a degradação da matriz polimérica, já que tais moléculas redutoras promovem a quebra das ligações dissulfeto entre as cadeias de Pct-SH. Ainda, com o intuito de clarificar as diferenças entre os processos de liberação de ACT dos hidrogéis nos diferentes meios de liberação testados (PBS, PBS + GSH e PBS + Cyst), os dados da liberação de ACT em todos os meios de liberação foram analisados usando o modelo cinético de Lagergren, sendo este um modelo de pseudo-primeira ordem (Gerola *et al.*, 2015). Neste Capítulo, esse modelo foi utilizado apenas para analisar a cinética de liberação e não a sua dinâmica ou mecanismo (Gerola *et al.*, 2015). O modelo de Lagergren é representado pela seguinte Eq. (10) (Gerola *et al.*, 2015):

$$\ln(Q_t - Q_\infty) = \ln Q_\infty + k_1 t \quad (10)$$

onde Q_t e Q_∞ são as quantidades de ACT (em mg) liberadas no tempo t ($t \neq 0$) e no ponto de equilíbrio, enquanto k_1 é a constante cinética de primeira ordem (min^{-1}). k_1 é obtida como o coeficiente angular do *plot* da Eq. (10) nos diferentes meios de liberação testados. Os valores de k_1 obtidos estão sumarizados na **Tabela 7**. De maneira geral, os valores de k_1 são maiores para a liberação de ACT nos meios contendo GSH e Cyst (**Tabela 7**). Portanto, a liberação de ACT dos hidrogéis Pct-SH na presença dos agentes redutores é mais rápida. De maneira geral, os valores de k_1 aumentam de acordo com a seguinte relação de meios de liberação: PBS + Cyst > PBS + GSH > PBS. Portanto, a liberação de ACT dos hidrogéis incubados no meio contendo Cyst é mais rápida do que no

meio suplementado com GSH. Essa diferença pode estar relacionada com uma diferença na difusão desses agentes redutores na matriz polimérica dos hidrogéis (Gerola *et al.*, 2015). A difusão de GSH através da matriz polimérica é um processo lento por conta de seu alto peso molecular (307 Da). Consequentemente, a GSH promove a quebra de poucas ligações dissulfeto e a degradação do hidrogel é limitada (CHOH; CROSS; WANG, 2011). Em contrapartida, a Cyst é capaz de difundir e penetrar a matriz polimérica dos hidrogéis rapidamente devido ao seu baixo peso molecular (121 Da) (CHOH; CROSS; WANG, 2011). Logo, a Cyst promove uma eficiente quebra das ligações dissulfeto, induzindo a degradação dos hidrogéis e uma maior quantidade de ACT é liberada em um curto intervalo de tempo.

Tabela 7. Parâmetros cinéticos da liberação de ACT dos hidrogéis Pct-SH preparados.

Hidrogel	Meio de liberação	Modelo cinético				
		Korsmeyer-Peppas			Lagergren	
		k_{KP}^a	n	R^2	k_1^b	R^2
Pct-SH ₍₅₋₁₎	PBS	0,078	0,360	0,965	0,003	0,905
	PBS + GSH	0,079	0,690	0,969	0,004	0,897
	PBS + Cyst	0,075	0,510	0,900	0,006	0,890
Pct-SH ₍₅₋₂₎	PBS	0,080	0,400	0,980	0,005	0,910
	PBS + GSH	0,081	0,650	0,988	0,006	0,900
	PBS + Cyst	0,030	0,190	0,920	0,006	0,910
Pct-SH ₍₅₋₃₎	PBS	0,014	0,601	0,961	0,004	0,902
	PBS + GSH	0,013	0,495	0,950	0,006	0,930
	PBS + Cyst	0,018	0,500	0,906	0,007	0,900
Pct-SH ₍₁₀₋₁₎	PBS	0,021	0,256	0,990	0,005	0,900
	PBS + GSH	0,048	0,896	0,943	0,005	0,970
	PBS + Cyst	0,033	0,500	0,918	0,004	0,917
Pct-SH ₍₁₀₋₂₎	PBS	0,028	0,294	0,991	0,004	0,915
	PBS + GSH	0,039	0,682	0,978	0,050	0,960
	PBS + Cyst	0,043	0,690	0,903	0,050	0,906
Pct-SH ₍₁₀₋₃₎	PBS	0,035	0,263	0,980	0,003	0,893
	PBS + GSH	0,027	0,650	0,930	0,005	0,922
	PBS + Cyst	0,025	0,700	0,880	0,005	0,900
Pct-SH ₍₁₅₋₁₎	PBS	0,026	1,041	0,988	0,004	0,900
	PBS + GSH	0,027	0,797	0,923	0,006	0,947
	PBS + Cyst	0,050	0,533	0,901	0,006	0,900
Pct-SH ₍₁₅₋₂₎	PBS	0,040	1,062	0,950	0,004	0,900
	PBS + GSH	0,039	0,681	0,940	0,005	0,900
	PBS + Cyst	0,046	0,540	0,909	0,004	0,950
Pct-SH ₍₁₅₋₃₎	PBS	0,046	1,001	0,950	0,003	0,947
	PBS + GSH	0,050	0,620	0,990	0,004	0,930
	PBS + Cyst	0,035	0,587	0,900	0,006	0,960

^a Parâmetro adimensional.

^b Unidade de medida é min⁻¹.

Para investigar o mecanismo de liberação de ACT dos hidrogéis Pct-SH, os dados de liberação em todos os meios (PBS, PBS + GSH e PBS + Cyst) foram tratados utilizando o modelo de Korsmeyer-Peppas (Wang, Yiming *et al.*, 2017). Esse modelo é matematicamente representado pela seguinte Eq. (11).

$$\log \frac{Q_t}{Q_\infty} = \log k_{KP} + n \log t \quad (11)$$

onde k_{KP} é a constante de Korsmeyer-Peppas e o parâmetro n (adimensional) é o expoente de Korsmeyer-Peppas. O parâmetro n está relacionado com o mecanismo geral de liberação de ACT dos hidrogéis (Wang, Yiming *et al.*, 2017). Segundo o modelo de Korsmeyer-Peppas, $n \leq 0,5$ indica um mecanismo de liberação baseado em pura difusão de Fick; $0,5 < n < 1,0$ está associado ao mecanismo anômalo de liberação, onde erosão da matriz e difusão do fármaco encapsulado ocorrem simultaneamente, e $n \geq 1,0$ sugere um mecanismo baseado no intumescimento e expansão da matriz polimérica (Lemos; de Souza; Fajardo, 2021). Os parâmetros k_{KP} e n podem ser obtidos a partir do *plot* da Eq. (11). Os valores de k_{KP} e n estão sumarizados na **Tabela 7** para cada condição experimental testada (na ausência ou presença de GSH e Cyst).

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 7**, os valores de n mudam drasticamente na ausência ou na presença dos agentes redutores no meio de liberação, logo, indicando diferentes mecanismos de liberação do ACT nessas condições. Para o meio de liberação sem agentes redutores (somente PBS), o mecanismo de liberação é dependente da composição dos hidrogéis. Os hidrogéis preparados com uma menor quantidade (Pct-SH₍₅₋₁₎, Pct-SH₍₅₋₂₎ e Pct-SH₍₅₋₃₎) e uma quantidade intermediária (Pct-SH₍₁₀₋₁₎, Pct-SH₍₁₀₋₂₎ e Pct-SH₍₁₀₋₃₎) de Pct-SH apresentaram valores de n menores que 0,5. Os hidrogéis contendo uma maior quantidade de Pct-SH (Pct-SH₍₁₅₋₁₎, Pct-SH₍₁₅₋₂₎ e Pct-SH₍₁₅₋₃₎) apresentaram valores de n maiores que 1. Portanto, na ausência dos agentes redutores, o mecanismo de liberação de ACT dos hidrogéis Pct-SH é baseado na difusão de Fick do ACT ou no intumescimento da matriz dos hidrogéis (Lemos; de Souza; Fajardo, 2021). Dessa forma, no meio de liberação composto

apenas por PBS, o mecanismo de liberação não depende da degradação dos hidrogéis. Em oposição, o mecanismo de liberação de ACT dos hidrogéis é completamente diferente na presença dos agentes redutores GSH e Cyst, como revelado pelos valores obtidos para n em tais condições (**Tabela 7**). De maneira geral, os valores de n variam entre 0,5 e 1,0. Logo, o mecanismo de liberação de ACT na presença dos agentes redutores é anômalo, onde a erosão da matriz polimérica e a difusão de ACT contribuem para o processo de liberação (Duceac *et al.*, 2021). Todos esses resultados comprovam que os hidrogéis Pct-SH preparados apresentam um comportamento responsivo à presença de agentes redutores, proporcionando uma interessante maneira para o controle da liberação de fármacos encapsulados nesses materiais.

Como uma observação final, a composição dos hidrogéis Pct-SH também influencia a liberação de ACT, como revelado pelos diferentes valores de k_1 (**Tabela 7**). Os valores de k_1 aumentam na seguinte ordem: Pct-SH 15% < Pct-SH 10% < Pct-SH 5%. Como observado, essa tendência é consistente com a densidade de reticulação desses materiais. Resumidamente, a liberação de ACT é mais rápida nos hidrogéis preparados com a menor quantidade de Pct-SH. Esse resultado indica que a liberação de fármacos encapsulados nos hidrogéis preparados pode ser adicionalmente controlado pela composição dos materiais.

4.4. Conclusão

Neste Capítulo, foi desenvolvida e apresentada uma simples e eficaz estratégia para o preparo de um hidrogel quimicamente reticulado por ligações dissulfeto utilizando o polissacarídeo pectina, o qual foi funcionalizado com grupos tióis (Pct-SH). Para o preparo do hidrogel, a Pct-SH foi tratada termicamente, juntamente com um agente oxidante (neste estudo, KPS), para oxidar os grupos tióis e formar as ligações dissulfeto entre as cadeias do polissacarídeo. Ainda, a partir do ajuste das quantidades da Pct-SH e KPS utilizadas no preparo do hidrogel, os materiais obtidos apresentaram diferentes graus de reticulação, os quais afetam suas propriedades. Por exemplo, a degradação dos hidrogéis pode ser controlada com a presença de agentes redutores, os quais promovem a quebra das ligações dissulfeto. Como verificado, a degradação dos hidrogéis é significativamente acelerada na presença dos agentes redutores fisiológicos GSH e Cyst. Essa característica permitiu o controle da liberação do fármaco ACT encapsulado nos hidrogéis na presença desses agentes redutores. Além disso, o hidrogel preparado é injetável e apresentou a habilidade de *self-healing*. Todos esses resultados indicam que os hidrogéis sintetizados são potenciais dispositivos para a liberação controlada de fármacos sensíveis à condição redox do meio.

Capítulo 5 – Hidrogel de carboximetil quitosana e hidroxietil celulose funcionalizada com grupos aldeído com potencial aplicação na liberação de fármacos

5.1. Introdução

Em aplicações que requerem o uso de hidrogéis baseados em polissacarídeos no interior do corpo humano (desconsiderando o trato gastrointestinal), a rota de administração mais conveniente aos pacientes é a injeção da solução precursora desses materiais no local alvo (Chen; Zhai; Edgar, 2022). No local alvo, a solução injetada sofre um processo de gelificação espontânea que resulta na formação *in situ* do hidrogel (He, Meng *et al.*, 2020). Essa estratégia de administração e aplicação apresenta diversas vantagens ao método tradicional, o qual consiste na introdução cirúrgica do hidrogel pré-formado (Dimatteo; Darling; Segura, 2018). Por exemplo, a baixa viscosidade da solução precursora permite a sua fácil injeção e evita o entupimento da agulha durante sua extrusão no local alvo (Chen; Zhai; Edgar, 2022). Tais características permitem a aplicação desse tipo de hidrogel em lesões profundas e garantem que o hidrogel formado adote a forma de tais lesões, um atributo que potencialmente aumenta sua compatibilidade com o tecido adjacente (Wang, Juan *et al.*, 2017).

Como observado, os benefícios dos hidrogéis formados *in situ* estão associados com a rápida gelificação da solução precursora. A gelificação deve ser suficientemente rápida para evitar o espalhamento da solução (e de qualquer fármaco incorporado) no local da injeção (Jiang *et al.*, 2021). Esse requisito pode ser atendido por hidrogéis sintetizados por reações químicas reversíveis de reticulação (Kataoka *et al.*, 2021). Nesse cenário, a reação de formação de bases de Schiff é interessante para esse fim por conta de sua rápida cinética de reação, ausência de catalisadores e meio reacional compatível com o meio fisiológico humano (CHEN *et al.*, 2020). Tipicamente, a formação de bases de Schiff ocorre entre aldeídos ou cetonas com diferentes tipos de amina (amina, hidrazina ou alcóxiaminas) (CHEN *et al.*, 2020). Curiosamente, o tipo de amina influencia a

estabilidade da ligação, enquanto a cinética da reação é controlada pela natureza do grupo carbonila (Patenaude *et al.*, 2014). De maneira geral, cetonas possuem uma reatividade limitada por causa do carbono adicional adjacente à carbonila que diminui sua eletrofilicidade e aumenta o impedimento estérico (Patenaude *et al.*, 2014). Logo, o uso de polissacarídeos contendo grupos aldeídos é preferível para a formação de hidrogéis *in situ*. Normalmente, a introdução desses grupos funcionais em polissacarídeos é efetuada através de sua oxidação utilizando periodato (Chen, Junyi *et al.*, 2020c). Essa reação promove a oxidação dos grupos hidroxila vicinais da unidade sacarídica do polissacarídeo para dialdeídos enquanto proporciona a destruição da unidade sacarídica. Outras desvantagens são a substancial redução do grau de polimerização do polissacarídeo e a introdução de uma grande instabilidade química ao mesmo (Nypelö *et al.*, 2021).

Para evitar as desvantagens da oxidação com periodato, a estratégia de funcionalização utilizada neste estudo é baseada na introdução de grupos aldeídos protegidos na forma de acetal na estrutura do polissacarídeo. A partir da hidrólise dos grupos acetal em meio levemente ácido, os grupos aldeídos são “desmascarados” e um polissacarídeo funcionalizado com tais grupos funcionais é obtido, idealmente com sua estrutura sacarídica intacta. Ainda, o polissacarídeo funcionalizado foi empregado na formação de um hidrogel *in situ* reticulado por ligações imina (base de Schiff). Hidroxietil celulose (HEC) foi selecionada como polissacarídeo alvo da funcionalização com grupos acetal e subsequente obtenção da HEC contendo grupos aldeídos (HEC-Ald). A HEC foi selecionada por conta de sua disponibilidade comercial, baixa citotoxicidade, biodegradabilidade e caráter neutro (Yin *et al.*, 2022b). Por sua vez, a carboximetil quitosana (CMQT) foi selecionada como polissacarídeo contendo grupos amina por causa de sua elevada solubilidade em água (Zhou *et al.*, 2023). A hipótese principal deste estudo é que as soluções de HEC-Ald e CMQT, quando misturadas, irão prontamente gelificar e, assim, habilitar a formação de um hidrogel *in situ*. Outra suposição é que os hidrogéis preparados por essa nova rota química de reticulação serão dinâmicos, responsivos à variação de pH, capazes de controlar a liberação de fármacos e não apresentaram uma grande toxicidade.

5.2. Experimental

5.2.1. Materiais

Hidroxietil celulose (HEC, M_w 105 kDa, $MS = 2,5$, $DS = 1,52$) foi adquirida da Spectrum Chemical (EUA). Quitosana (QT, M_v 190–310 kDa, grau de desacetilação de 76%), hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, acetato de sódio, iodeto de sódio, hidreto de sódio, cianoborohidreto de sódio, cloreto de potássio, dihidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato de potássio, Cibacron Blue 3G-A, ácido monocloroacético, álcool isopropílico, ácido clorídrico, dimetilformamida (DMF) e *tert*-butilamina foram comprados da Sigma-Aldrich (EUA) e utilizados sem purificação prévia. 2-Cloroacetaldeído dimetil acetal e vanilina foram adquiridos da Across Organics (EUA) e utilizados sem purificação prévia. Todos os solventes utilizados foram secos em peneiras moleculares antes de sua utilização. A membrana de diálise Spectra/Por 7 (MWCO 3,5 kDa) foi comprada da Thermo Fischer Scientific (EUA).

5.2.2. Procedimento geral para a síntese e desproteção ácida da hidroxietil celulose funcionalizada com grupos acetal (HEC-Ald)

HEC (0,50 g, 1,63 mmol AGU, 4,98 mmol $-OH$) foi dissolvida em DMF (20 mL) por 2 h a 60 °C. Concomitantemente, NaOH (1,95 g, 10 equiv por $-OH$) foi pulverizado até um pó fino e dispersado em uma pequena quantidade de DMF (5 mL). Essa solução foi adicionada ao frasco reacional sob atmosfera de $N_{2(g)}$. Posteriormente, 2-cloroacetaldeído dimetil acetal (8 mL, 15 equiv por $-OH$) foi gotejado lentamente no meio reacional sob agitação constante. Por fim, NaI (9 g, 1 equiv por acetal) foi adicionado ao meio e a solução heterogênea resultante permaneceu sob agitação constante por 48 h a 70 °C. Subsequentemente, o meio reacional foi dialisado com água destilada durante 48 h. Assim, a HEC funcionalizada com grupos acetal (denominada de HEC-Acetal) foi recuperada por liofilização na temperatura de -55 °C após 96 h. **Rendimento:** 70% (0,35 g, 1,40 mmol AGU). **RMN de 1H (500 MHz, D_2O , δ , ppm):** 4,50 (H 1, próton anomérico), 4,01–3,03 (H 2–H 6, prótons da unidade sacarídica da celulose; $-OCH_2CH_2-$, prótons dos grupos hidroxietil; $-OCH_2CH(OCH_3)_2$ e $-OCH_2CH(OCH_3)_2$, prótons da estrutura carbônica da porção acetal enxertada) e

3,55 (–OCH₂CH(OCH₃)₂, prótons dos grupos metil da porção acetal). O DS foi estimado pela Eq. (12).

$$DS (Acetal) = \frac{1}{6} \frac{I_{CH3}}{I_{H1}} \quad (12)$$

Essa equação relaciona a área total do sinal de ressonância atribuído aos prótons dos grupos metil da porção acetal enxertada (em 3,55 ppm) com a área do sinal referente ao próton anomérico (em 4,50 ppm). Na Eq. (12), I_{CH3} e I_{H1} são as áreas dos sinais mencionados obtidas por integração. Por meio dessas relações, o DS(Acetal) da HEC-Acetal sintetizada foi estimado.

Em seguida, os grupos acetal introduzidos na estrutura da HEC-Acetal foram convertidos para aldeídos por meio de uma reação de hidrólise ácida. Para isso, HEC-Acetal (0,50 g) foi solubilizada em uma solução diluída de HCl (20 mL, 0,20 mol L⁻¹) sob agitação constante por 8 h a 80 °C. Após esse período, a solução foi resfriada até a temperatura ambiente e neutralizada pela adição de algumas gotas de NaHCO₃ (5% m/m). A solução neutralizada foi dialisada em água destilada por 48 h. O produto contendo os grupos aldeídos (designado como HEC-Ald) foi recuperado por liofilização na temperatura de -55 °C após 96 h. **Rendimento:** 64% (0,32 g, 1,70 mmol AGU). **RMN de ¹H (500 MHz, D₂O, δ, ppm):** 9,50 (CH₂O, próton do grupo aldeído livre), 4,90 (CH₂(OH)₂, prótons dos grupos aldeídos hidratados), 4,50 (H 1, próton anomérico) e 4,01–3,03 (H 2–H 6, prótons da unidade sacarídica da celulose; –OCH₂CH₂–, prótons dos grupos hidroxietil; –OCH₂CH(OH)₂, prótons da estrutura carbônica da porção enxertada contendo os grupos aldeídos). A eficiência da conversão de grupos acetal para grupos aldeído foi estimada através da Eq. (13) e DS (Aldeído) por meio da Eq. (14).

$$Conversão (\%) = \frac{DS (Acetal)_f}{DS (Acetal)_i} \times 100\% \quad (13)$$

$$DS (\text{Aldeído}) = \frac{I_{Ald}}{I_{H1}} \quad (14)$$

Nessas equações, $DS (\text{Acetal})_f$ e $DS (\text{Acetal})_i$ são os valores do DS dos polissacarídeos funcionalizados antes e depois da reação de hidrólise ácida. I_{Ald} é a área do sinal dos prótons associados aos grupos aldeído (em 4,90 ppm e 9,50 ppm).

5.2.3. Identificação e quantificação dos grupos aldeídos na HEC-Ald

A identificação e quantificação dos grupos aldeídos presentes na estrutura da HEC-Ald foram realizados a partir da reação desses grupos funcionais com *tert*-butilamina, como previamente proposto por NICHOLS *et al.* (2020). Para isso, HEC-Ald (0,02 g, 0,12 mmol AGU) foi solubilizada em DMF (1,30 mL) por 2 h na temperatura de 60 °C. Em seguida, *tert*-butilamina (0,38 mL, 30 equiv por AGU) foi adicionada na solução, que permaneceu sob agitação constante por 24 h a 50 °C. Decorrido esse intervalo de tempo, NaBH₃CN (0,075 g, 10 equiv por AGU) foi acrescentado no meio reacional. A mistura resultante foi, então, agitada constantemente por 24 h a temperatura ambiente. Para recuperar o produto, o meio reacional foi gotejado em acetona gelada (20 mL) e o precipitado formado foi coletado por filtração a vácuo e extensivamente purificado com etanol. O produto purificado foi seco em uma estufa a vácuo na temperatura de 50 °C. **Rendimento:** 80% (0,016 g, 0,062 mmol AGU). **RMN de ¹H (500 MHz D₂O, δ, ppm):** 4,50 (H 1, próton anomérico), 4,01–3,03 (H 2–H 6, prótons da unidade sacarídica da celulose; –OCH₂CH₂–, prótons dos grupos hidroxietil; –OCH₂CH₂N(CH₃)₃, prótons da estrutura carbônica contendo a *tert*-butilamina enxertada), 2,92–2,00 (resíduos de DMF e acetona) e 1,24 (N(CH₃)₃, prótons dos grupos metil da *tert*-butilamina enxertada). Nesse caso, uma molécula de *tert*-butilamina reage com um grupo aldeído. Logo, DS (*tert*-butilamina) possui o mesmo valor que DS (Aldeído). Isto posto, o DS (*tert*-butilamina) foi estimado pela seguinte Eq. (15):

$$DS (terc - butilamina) = \frac{1 I_{CH3}}{9 I_{H1}} \quad (15)$$

onde I_{CH3} é a área do sinal referente aos sinais de ressonância dos prótons dos grupos metila da *terc*-butilamina (em 1,24 ppm).

5.2.4 Síntese da carboximetil quitosana (CMQT)

A CMQT foi sintetizada de acordo com o procedimento proposto por ZHOU *et al.* (2023). Para isso, NaOH (5,40 g) foi dissolvido em uma mistura de IPA (32 mL) e água destilada (8 mL). Após completa dissolução da base, QT (4 g) foi adicionada e a mistura heterogênea foi agitada constantemente por 1 h a 50 °C. Posteriormente, ácido monocloroacético (6 g) foi dissolvido em IPA (8mL) e, então, adicionado gota-a-gota na solução de QT. Essa solução foi agitada constantemente durante 4 h a 50 °C. Após esse período, uma mistura de água/etanol (70%-v/v, 80 mL) foi adicionada ao meio reacional para precipitar o produto, que foi recuperado por filtração a vácuo. Esse produto foi dissolvido em água (100 mL) e centrifugado (8000 rpm por 6 min) para remover materiais insolúveis. Finalmente, a solução centrifugada foi dialisada com água destilada (2 L) durante 48 h. A CMQT purificada foi obtida após liofilização. **Rendimento:** 60% (2,43 g). **RMN de 1H (500 MHz, D_2O , δ , ppm):** 4,46 (H 1, próton anomérico), 3,90 ($-OCH_2COOH$, prótons dos grupos carboximetílicos enxertados nas posições C-3 e C-6), 3,80–3,30 (prótons da estrutura carbônica principal da QT (GlcN e GlcNAc), 3,29 ($-NCH_2COOH$, prótons dos grupos carboximetílicos enxertados na posição C-2) e 1,99 ($-NCOCH_3$, prótons metílicos da porção acetilada da QT). Por meio do espectro de RMN de 1H da CMQT, o DS(carboximetil) total foi estimado pela soma do DS(O-carboximetilação) e DS(N-carboximetilação), os quais foram calculados pelas seguintes equações (Zhou2023):

$$DS (O - carboximetilação) = \frac{1 I_{OCH_2COOH}}{2 I_{H1}} \quad \text{Eq. (16)}$$

$$DS (N - \text{carboximetilação}) = \frac{1}{2} \frac{I_{NCH_2COOH}}{I_{H_1}} \quad \text{Eq. (17)}$$

onde I_{OCH_2COOH} e I_{NCH_2COOH} são as áreas dos respectivos sinais (obtidas por integração).

5.2.5. Procedimento geral para o preparo dos hidrogéis HEC-Ald/CMQT

Para o preparo dos hidrogéis, quantidades específicas de HEC-Ald e CMQT foram dissolvidas separadamente em PBS (pH 7,4) sob agitação constante. A partir da mistura do mesmo volume de tais soluções (0,20 mL), a solução resultante foi imediatamente incubada na temperatura de 37 °C até sua gelificação. A formação do hidrogel e o tempo de gelificação foram determinados através do método de inversão do frasco (Ye *et al.*, 2016). Nesse estudo, a quantidade total de sólido (5, 10 e 15%) e a razão mássica entre HEC-Ald:CMQT (5:1, 1:1 e 1:5) foram variadas com o objetivo de identificar as melhores condições para a gelificação. Portanto, diferentes concentrações de HEC-Ald e CMQT foram utilizadas para o preparo dos hidrogéis. A **Tabela 8** sumariza as composições e formulações empregadas.

Tabela 8. Formulações utilizadas para o preparo do hidrogel HEC-Ald/CMQT.

Teor total de sólido (% m/m)	Razão mássica HEC-Ald:CMQT (m/m)	Concentração da solução de HEC-Ald (%)	Concentração da solução de CMQT (%)
5	5:1	4,1	0,9
	1:1	2,5	2,5
	1:5	0,9	4,1
10	5:1	8,5	1,5
	1:1	5	5
	1:5	1,5	8,5
15	5:1	12,5	2,5
	1:1	7,5	7,5
	1:5	2,5	12,5

5.2.6. Técnicas de caracterização

Espectroscopia de FTIR foi realizada em um espectrômetro Shimadzu (modelo 300, Japão) operando na faixa espectral de 4000 a 600 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . RMN de hidrogênio (^1H) foi realizada em um espectrômetro Bruker (modelo Avance II 500, EUA) operando a 500 MHz. Os espectros foram obtidos em água deuterada e DSS foi utilizado como padrão interno. Medidas de cromatografia de permeação em gel (GPC) foram feitas a 40 °C em um sistema Agilent equipado com uma coluna Shodex Ohpak LB-806 M. As medidas de peso molecular médio foram realizadas por meio de um detector de índice de refração Optilab e de outro detector de espalhamento de luz Wyatt Dawn 8.

Para as análises reológicas, o reômetro TA Discovery HR-30 equipado com a geometria de placas paralelas (placa de Peltier e placa superior de 20 mm) foi utilizado. O gap entre a placa de Peltier e a placa superior foi variado de acordo com os experimentos, que foram conduzidos a 37 °C. Para evitar a evaporação de água das amostras, uma pequena quantidade de óleo mineral de baixa viscosidade foi utilizado nas bordas da interface placa-amostra. Para a investigação da cinética de gelificação, o mesmo volume das soluções dos polímeros (500 μL) foram adicionados diretamente na placa de Peltier e a cabeça do reômetro foi movida até o gap programado (neste caso, 1100 μm). A amostra foi submetida a um grau de deformação de 0,1% e uma frequência de oscilação de 0,5 Hz. Os módulos de G' e G'' foram registrados em função da variação do tempo a cada 6 s. Para os testes de variação de amplitude (tensão ou deformação de cisalhamento), as amostras do hidrogel foram preparadas diretamente na placa de Peltier por meio da adição da mesma quantidade da solução dos polímeros (1000 μL), que foram manualmente misturadas, e gelificadas por 5 min para garantir completa gelificação e reticulação. O gap desses experimentos foi definido como 3000 μm . Para os experimentos de variação da deformação de cisalhamento, as amostras foram submetidas à uma variação da deformação de 0,01% até 400% com uma frequência constante de 0,5 Hz. Nos experimentos de variação de frequência, a frequência foi variada de 0,01 Hz até 4,00 Hz com uma deformação de cisalhamento constante de 1%. Para os experimentos de relaxamento de estresse e fluência- recuperação, os hidrogéis foram preparados como descrito anteriormente. Nos experimentos de

relaxamento de tensão, a amostra foi submetida a uma deformação de cisalhamento de 1, 10 ou 100% e a dispersão do estresse (isto é, tensão) gerado foi acompanhada pelo reômetro, onde um gap de 3000 μm foi utilizado. Nos experimentos de fluência-recuperação, tensões de cisalhamento de 10, 100 e 300 Pa foram aplicadas nas amostras durante 180 s e a deformação induzida registrada durante a aplicação e retirada do estresse.

Análises de compressão mecânica também foram realizadas com o hidrogel preparado. Essa análise foi conduzida em um sistema de ensaio universal Instron 3340 (EUA). O hidrogel preparado foi moldado em um cilindro com diâmetro de 1,5 cm e altura de 2 cm. Uma célula de 2 kN foi utilizada para esse experimento e uma taxa de compressão de 1 mm min⁻¹ foi aplicada. Os testes mecânicos de compressão foram realizados em triplicata ($n = 3$) e na temperatura ambiente. Os experimentos de intumescimento e perda de massa do hidrogel preparado foram realizados seguindo o mesmo procedimento descrito no Capítulo 3. Porém, neste estudo, tais experimentos foram conduzidos em meios tamponados com pH 1,2 (tampão ácido), pH 5,2 (tampão acetato) e pH 7,4 (tampão fosfato) e na temperatura de 37 °C. Em determinados intervalos de tempo, as amostras foram pesadas novamente. Os experimentos foram realizados em triplicata e o grau de intumescimento e perda de massa foram estimados utilizando as Eq. (2) e Eq. (3), respectivamente.

5.2.7. Encapsulação e ensaio de liberação

A vanilina (VN) foi selecionada como fármaco modelo para investigar as propriedades de encapsulação e liberação do hidrogel HEC-Ald/CMQT. Os hidrogéis carregados com VN foram preparados pela mistura do mesmo volume (0,5 mL) das soluções de CMQT (12,5 % m/v) e HEC-Ald (2,5 % m/v) preparadas em PBS (pH 7,4). Entretanto, VN (10 mg) foi diretamente adicionada à solução de HEC-Ald. Após a mistura, a solução resultante foi incubada na temperatura de 37 °C, gelificando após 1 min. O hidrogel contendo VN foi seco por liofilização e amostras secas foram utilizadas para os ensaios de liberação *in vitro*. Para os ensaios de liberação da VN, amostras do hidrogel contendo VN (100 mg) foram colocadas em uma membrana de diálise (MWCO 3,5 kDa), que foi fechada com

linhas de nylon. Esse sistema foi imerso no meio de liberação (20 mL) que consistiu em meio tamponado pH 1,2 (tampão ácido), pH 5,2 (tampão acetato) ou pH 7,4 (tampão fosfato). Os experimentos foram conduzidos na temperatura de 37 °C e, após determinados intervalos de tempo, alíquotas do meio (3 mL) foram coletadas e analisadas em um espectrofotômetro UV-Vis (Evolution 300, EUA). A concentração de VN liberada foi quantificada utilizando uma curva de calibração realizada em cada meio de liberação tamponado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5.2.8. Ensaio de viabilidade celular

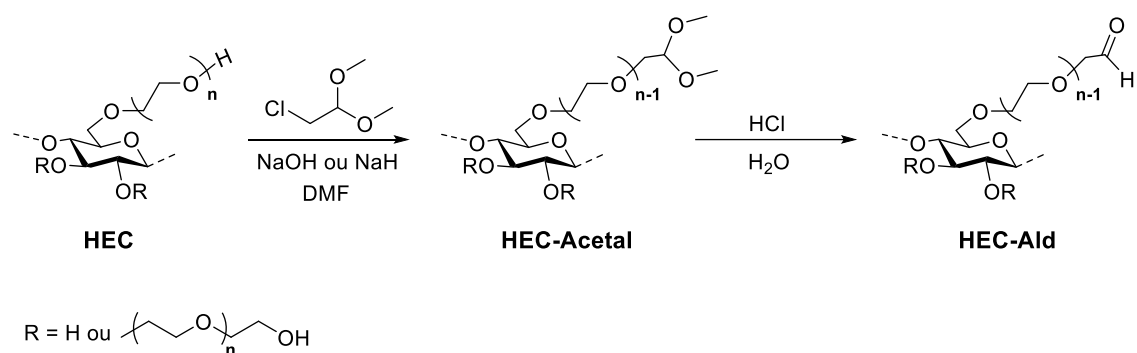
Células normais originárias do tecido mamário (denominadas de HB4a) foram cultivadas no meio RPMI1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco). As células foram mantidas em um incubador umidificado com temperatura controlada de 37 °C e atmosfera com 5% CO₂. Uma quantidade igual a 5×10^3 células foi semeada em cada poço de uma placa de cultura celular (contendo 96 poços). Essas células foram tratadas com quantidades do hidrogel HEC-Ald/CMQT equivalente com as concentrações de 0 (controle), 0,1 e 0,01 mg mL⁻¹. A viabilidade celular foi estimada pelo ensaio de MTT através da análise da densidade óptica (VANDELOOSDRECHT *et al.*, 1994). Cada ensaio foi realizado em triplicata.

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Otimização da síntese e desproteção ácida da HEC-Acetal

Inicialmente, a HEC foi funcionalizada com grupos acetal, precursores dos grupos aldeídos a partir da reação de hidrólise ácida, por meio de uma rota sintética que não promove a destruição da estrutura polissacarídica da HEC, como demonstrado no **Esquema 1**. Os grupos hidroxila da HEC reagem, após desprotonação na presença de uma base, com o 2-cloroacetaldeído dimetil acetal através de uma simples reação de eterificação por meio de um mecanismo de substituição nucleofílica de segunda ordem (SN₂). É interessante notar que essa estratégia permite a funcionalização de polissacarídeos de caráter neutro

com grupos acetal e não requer a presença de grupos funcionais peculiares (por exemplo, grupos amina ou carboxila) na estrutura desses polímeros. De fato, essa rota de funcionalização utiliza apenas grupos hidroxila, presentes na unidade sacarídica de todos os polissacarídeos.



Esquema 1. Esquema reacional da funcionalização da HEC com 2-cloroacetaldeído dimetil acetal e sua subsequente reação de hidrólise ácida. As estruturas da HEC e seus derivados foram representadas desta maneira para facilitar a visualização e não indicam regioselectividade.

Com o objetivo de adquirir o derivado HEC-Acetal com o maior DS possível, a síntese desse polímero foi otimizada e os resultados estão descritos na **Tabela 9**. O DS foi estimado a partir dos espectros de RMN de ^1H dos produtos recuperados, os quais podem ser encontrados no **Apêndice C**. Nos primeiros experimentos, NaOH foi utilizada como base da reação. Nessa condição, a HEC não foi funcionalizada com os grupos acetal (**Tabela 9**, entrada 1). Esse resultado pode estar relacionado com a ocorrência de reações de eliminação no meio reacional concomitantemente com a reação de substituição. Essas reações são muito comuns em meios reacionais fortemente alcalinos e desfavorecem a reação de substituição (Lachia *et al.*, 2011). Uma estratégia eficiente para favorecer a reação de substituição é a utilização de um bom grupo de saída. Dessa forma, a reação de funcionalização foi realizada novamente nas mesmas condições experimentais anteriores (**Tabela 9**, entrada 1), porém, NaI foi adicionado ao meio reacional como catalisador nucleofílico para gerar *in situ* o derivado 2-iodoacetaldeído dimetil acetal, o qual possui maior reatividade frente reações de substituição (Gao; Liu; Edgar, 2018; Seeman, 1983). Na

presença de NaI, a reação de substituição foi bem-sucedida (**Tabela 9**, entrada 2), como revelado pelo espectro de RMN de ^1H do produto obtido, que pode ser encontrado na **Figura 32**. O espectro do produto HEC-Acetal apresentou um novo sinal de ressonância em 3,55 ppm atribuído aos prótons dos grupos metila da porção acetal enxertada. A partir da integração desse sinal, um DS modesto de 0,12 foi estimado. Curiosamente, o aumento da quantidade de NaI no meio reacional não resultou em um aumento do DS (**Tabela 9**, entrada 3).

Tabela 9. Condições experimentais testadas e resultados da síntese da HEC-Acetal.

Entrada	Acetal (equiv/-OH)	Base (equiv/-OH)	NaI (equiv/Acetal)	DS (Acetal)
1	15	10	–	–
2	15	10	1	0,12
3	15	10	2	0,12
4 ^a	15	10	1	0,09
5	20	10	1	0,06
6	10	10	1	–
7	15	5	1	–
8 ^b	15	10	1	0,12

^a NaH foi utilizada como base.

^b Tempo de reação de 96 h. Em todas outras condições, o tempo de reação foi 48 h.

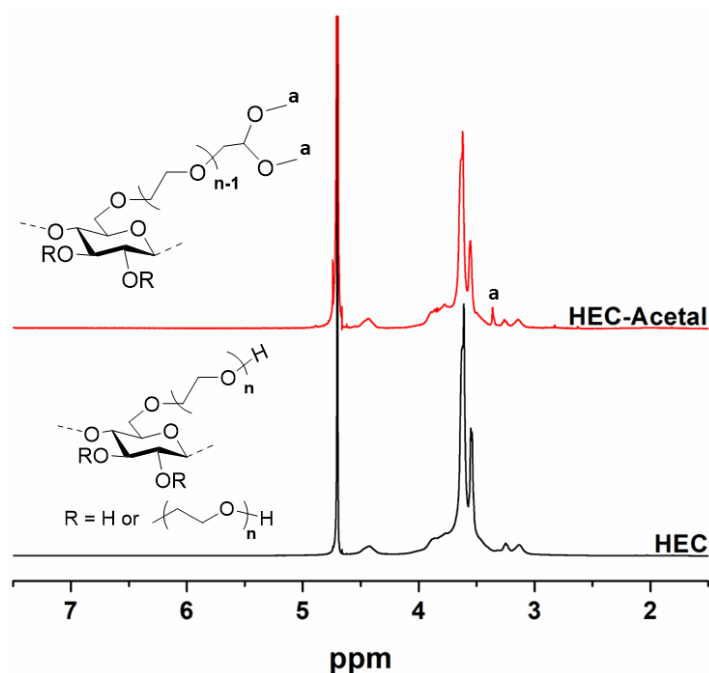


Figura 32. Espectros de RMN de ^1H da HEC e HEC-Acetal em D_2O .

Com o objetivo de aumentar o DS do HEC-Acetal obtido, a reação de funcionalização foi realizada com uma diferente base. Nesse caso, NaOH foi substituído por NaH, uma base forte com maior potencial de desprotonar os grupos hidroxila da HEC e, potencialmente, aumentar o DS(Acetal). Contudo, a reação realizada com NaH, na presença de NaI, resultou em um DS menor (**Tabela 9**, entrada 4). Provavelmente, esse resultado inesperado está relacionado com a predominância das reações de eliminação que competem com a substituição por conta da elevada basicidade do NaH, um fator que reconhecidamente favorece a rota de eliminação (Barham *et al.*, 2018; Lachia *et al.*, 2011). Definindo NaOH como base preferencial, a quantidade de 2-cloroacetaldeído dimetil acetal (por grupos $-\text{OH}$ da HEC) foi aumentada, mas isso não resultou no aumento do DS do produto obtido (**Tabela 9**, entrada 5). Esse resultado sugere a facilidade do 2-cloroacetaldeído dimetil acetal para sofrer reações de eliminação, possivelmente, devido à presença de uma ligação C-H ácida na porção acetal do reagente 2-cloroacetaldeído dimetil acetal. Realmente, quando uma pequena quantidade de 2-cloroacetaldeído dimetil acetal (10 equiv por $-\text{OH}$) foi utilizada, a reação não ocorreu (**Tabela 9**, entrada 6). Por último, a reação de funcionalização da HEC com grupos acetal foi

realizada com uma menor quantidade de NaOH (5 equiv por $-OH$) para investigar se a menor quantidade de base beneficiaria a reação de substituição e, por conseguinte, aumentaria o valor do DS(Acetal). Entretanto, a reação não ocorreu com menor quantidade de NaOH (**Tabela 9**, entrada 7). Ainda, aumentando o tempo de reação de 48h para 96h também não resultou no aumento do DS (**Tabela 9**, entrada 8). Tendo em vista todos os resultados obtidos, as melhores condições para a síntese do HEC-Acetal são àquelas descritas na entrada 2 da **Tabela 9**, onde um DS(Acetal) igual a 0,12 foi obtido.

Embora tenha sido possível a obtenção do produto HEC-Acetal por meio da rota sintética proposta (**Esquema 1**), o seu espectro de RMN de 1H não revelou nenhuma informação acerca da regioseletividade da reação por conta do baixo DS(Acetal). Entretanto, é possível especular que a reação de funcionalização da HEC com os grupos acetal do 2-cloroacetaldeído dimetil acetal ocorre, majoritariamente, na porção terminal dos grupos hidroxietil. Essa suposição é reforçada pelo número moderado de grupos $-OH$ disponíveis na HEC ($DS(OH) \ 3 - 1,52 = 1,48$; grande parte são os grupos 3-OH, os quais são pouco reativos) e a maior reatividade dos grupos hidroxietil (Fox *et al.*, 2011). De acordo com outros estudos que abordam a funcionalização da HEC, a maior parte de tais funcionalizações ocorrem no grupo hidroxila terminal dos grupos hidroxietil, os quais possuem maiores ângulos de aproximação e maior reatividade (Abbas *et al.*, 2017a, 2017b; Arukalam *et al.*, 2014).

Em seguida, as melhores condições para a reação de desproteção ácida da HEC-Acetal foram investigadas, onde o derivado com o maior DS(Acetal) foi utilizado (**Tabela 9**, entrada 2). A reação de desproteção foi baseada na reação de hidrólise ácida dos grupos acetal utilizando uma solução de HCl diluído ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$). Essa reação foi realizada em diferentes temperaturas e tempos reacionais a fim de minimizar a perda de DP (e peso molecular) enquanto maximizando a conversão dos grupos acetal para aldeídos. Os espectros de RMN de 1H dos derivados hidrolisados (HEC-Ald) são apresentados na **Figura 33**. Como observado, todos os derivados possuem em seus respectivos espectros um novo sinal de ressonância em 4,90 ppm atribuído ao próton α dos grupos aldeídos hidratados (Baker; Tam; Shoichet, 2017) e uma redução substancial da intensidade do sinal associado aos grupos metil da porção acetal

(destacada na **Figura 33**). Inicialmente, HEC-Acetal foi hidrolisado na temperatura de 25 °C durante 48h, onde uma conversão de grupos acetal para aldeídos de apenas 53% foi obtida. A baixa conversão obtida é surpreendente, porém, a eficiência de várias reações orgânicas é reconhecidamente menor em polissacarídeos por causa da lenta difusão desses reagentes no meio reacional e seus limitados ângulos de aproximação (Nichols *et al.*, 2020; Volokhova; Edgar; Matson, 2020).

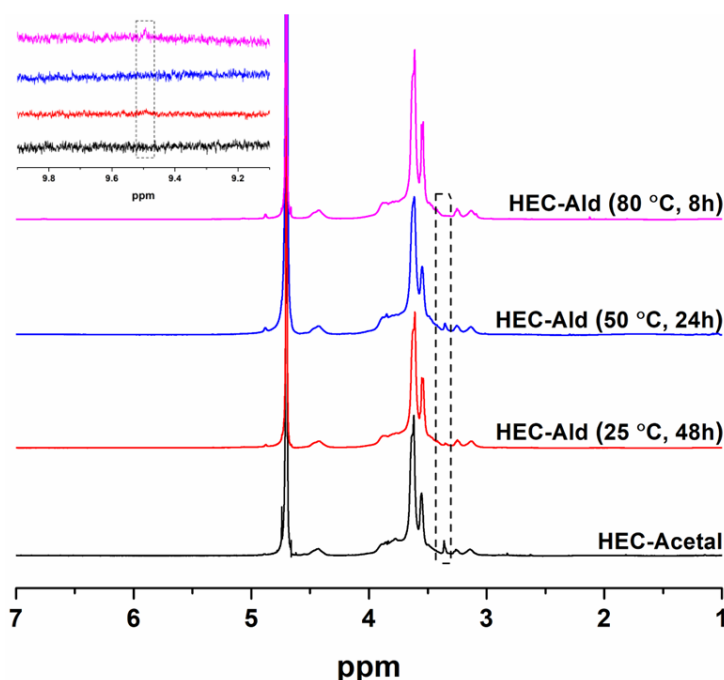


Figura 33. Espectros de RMN de ^1H dos produtos HEC-Ald hidrolisados em diferentes condições em D_2O . O *inset* mostra a região do espectro típica do sinal do próton α do grupo aldeído.

Portanto, para aumentar a eficiência da reação de desproteção ácida da HEC-Acetal, a hidrólise ácida foi conduzida em elevadas temperaturas, ao mesmo tempo em que o tempo reacional foi reduzido como uma medida para mitigar a perda de DP. Como uma primeira tentativa, a temperatura da reação foi aumentada para 50 °C e o tempo de reação foi reduzido para 24 h. Nessa condição, uma conversão de apenas 53% foi atingida. O subsequente aumento da temperatura para 80 °C e redução do tempo reacional para 8 h resultaram na completa conversão dos grupos acetal para aldeídos, como é possível verificar através da ausência do sinal referente aos prótons metílicos da porção acetal no

espectro de RMN de ^1H do produto hidrolisado nessas condições. Além disso, esse mesmo espectro apresenta um fraco sinal em 9,50 ppm associado ao próton característico de aldeídos (*inset* na **Figura 33**). A completa conversão dos grupos acetal para aldeídos na temperatura de 80 °C foi confirmada por meio da reação da HEC-Ald, obtida nessa condição, com *terc*-butilamina. A partir da análise do espectro de RMN de ^1H do produto descrito na **Figura 34**, um DS de 0,12 foi obtido, logo, confirmando a completa desproteção dos grupos acetal. A integração dos sinais dos aldeídos (em sua forma livre e hidratada) reforçam esse DS. Como esperado, o peso molecular do HEC-Ald foi reduzido de 105 kDa para 30,5 kDa. Entretanto, essa redução é relativamente menor que a observada na oxidação com periodato (Nypelö *et al.*, 2021). Ainda, o anel piranose não é destruído por esse método, como ocorre na oxidação com periodato. Haja visto que o HEC-Ald obtido pela reação de desproteção na temperatura de 80 °C por 8 h apresentou a maior conversão (e maior quantidade de aldeídos), esse derivado foi selecionado para o preparo dos hidrogéis.

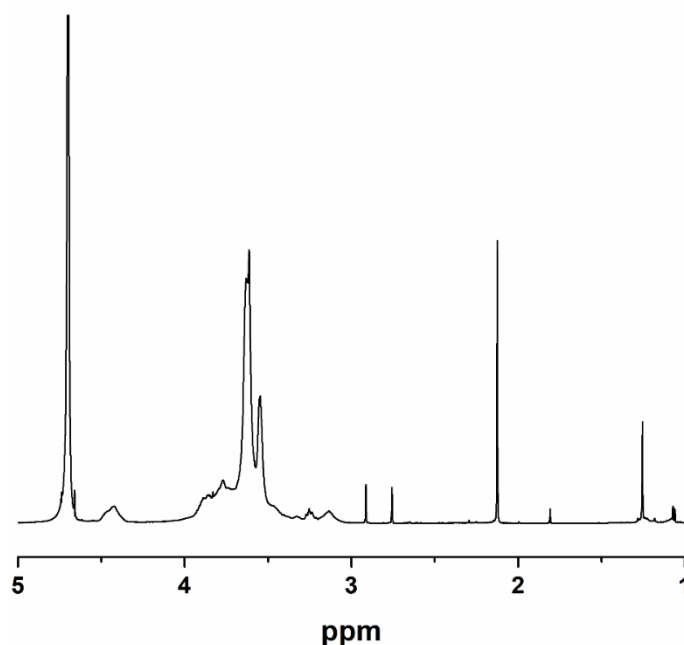


Figura 34. Espectro de RMN de ^1H do produto da reação entre HEC-Ald e *terc*-butilamina em D_2O .

5.3.2. Síntese da CMQT

Neste estudo, a carboximetil quitosana (CMQT) foi sintetizada por meio da reação de carboximetilação da QT (DS(Acetil) 0,24, calculado a partir do grau de desacetilação de 76%) com ácido monocloroacético na presença de NaOH (Yan *et al.*, 2021). Em geral, essa reação não é seletiva e *O*- e *N*-carboximetilação podem ocorrer. Contudo, em condições fortemente alcalinas, os grupos hidroxila da QT são desprotonados e os grupos alcóxidos gerados são capazes de competir eficientemente com os grupos amina na reação de carboximetilação (Zhou *et al.*, 2023). A obtenção da CMQT (como sal de sódio) foi confirmada por meio da técnica de RMN de ^1H , cujo espectro é mostrado na **Figura 35**. Como observado, o espectro da CMQT apresenta um sinal de ressonância em 3,90 ppm referente aos prótons da estrutura carbônica dos grupos carboximetílicos nas posições 3- e 6-*O*. Entretanto, o sinal de ressonância em 3,31 ppm indica a carboximetilação dos grupos amina (Zhou *et al.*, 2023). Levando em consideração as áreas desses sinais, o DS(carboximetil) combinado nas posições 3- e 6-*O* foi estimado como 1,14 e 0,38 na posição 2-*N*. Dessa forma, o DS de grupos amina livre foi calculado como 0,38 ($\text{DS(amina)} = 1 - \text{DS(2-N-carboximetilação)} - \text{DS(Acetil)}$).

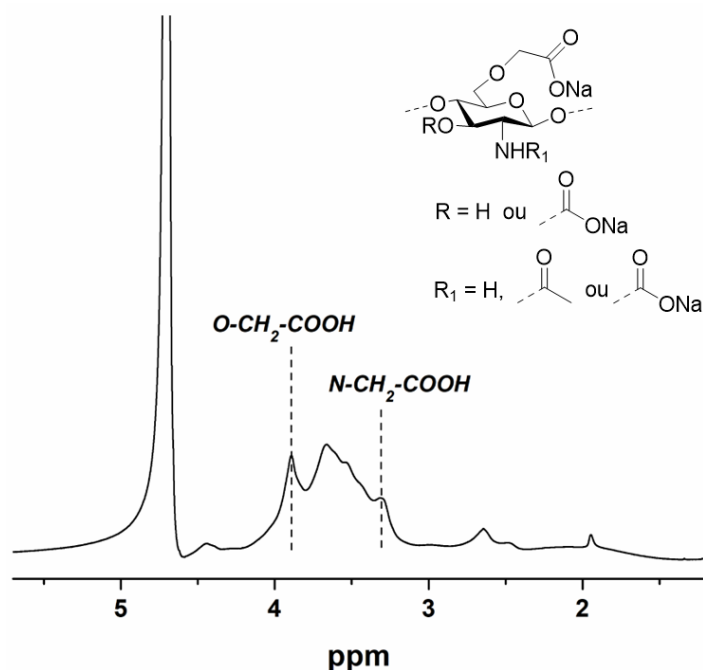


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H da CMQT sintetizada em D_2O .

5.3.3. Preparo do hidrogel HEC-Ald/CMQT

Teoricamente, grupos aldeídos reagem espontaneamente com grupos amina para formar bases de Schiff contendo ligações imina (Zhou *et al.*, 2023). Isto posto, rápida gelificação da mistura entre as soluções de HEC-Ald (aldeído) e CMQT (amina) é esperada por conta da formação de ligações imina entre esses derivados. O processo de gelificação das soluções dos polissacarídeos resulta na formação do hidrogel HEC-Ald/CMQT, como mostrado na **Figura 36a**. Nesse sentido, uma preocupação em relação ao método proposto é a hidratação dos grupos aldeídos da HEC-Ald, como identificado no espectro de RMN de ^1H desse derivado. Em água, os grupos aldeídos hidratados estão em equilíbrio com sua forma livre não-hidratada, apesar do equilíbrio favorecer a primeira espécie (Lázaro Martínez *et al.*, 2010). Contudo, uma hipótese válida é que o consumo dos grupos aldeídos livres durante a formação das ligações imina irá deslocar o equilíbrio em favor dessa espécie química, como previsto pelo princípio de Le Châtelier (Bentley; Roberts; Harris, 1998; Godoy-Alcántar; Yatsimirsky; Lehn, 2005). Concomitantemente, o meio levemente alcalino também favorece o aldeído livre e sua reatividade com grupos amina, evitando-se a formação de acetais e hemiacetais (Godoy-Alcántar; Yatsimirsky; Lehn, 2005; Zott; Korotenko; Zipse, 2022). *A priori*, a execução da reação de condensação entre os grupos aldeídos e aminas em meio PBS levemente alcalino (pH 7,4) favorece a formação da ligação imina e o processo de gelificação das soluções de HEC-Ald e CMQT.

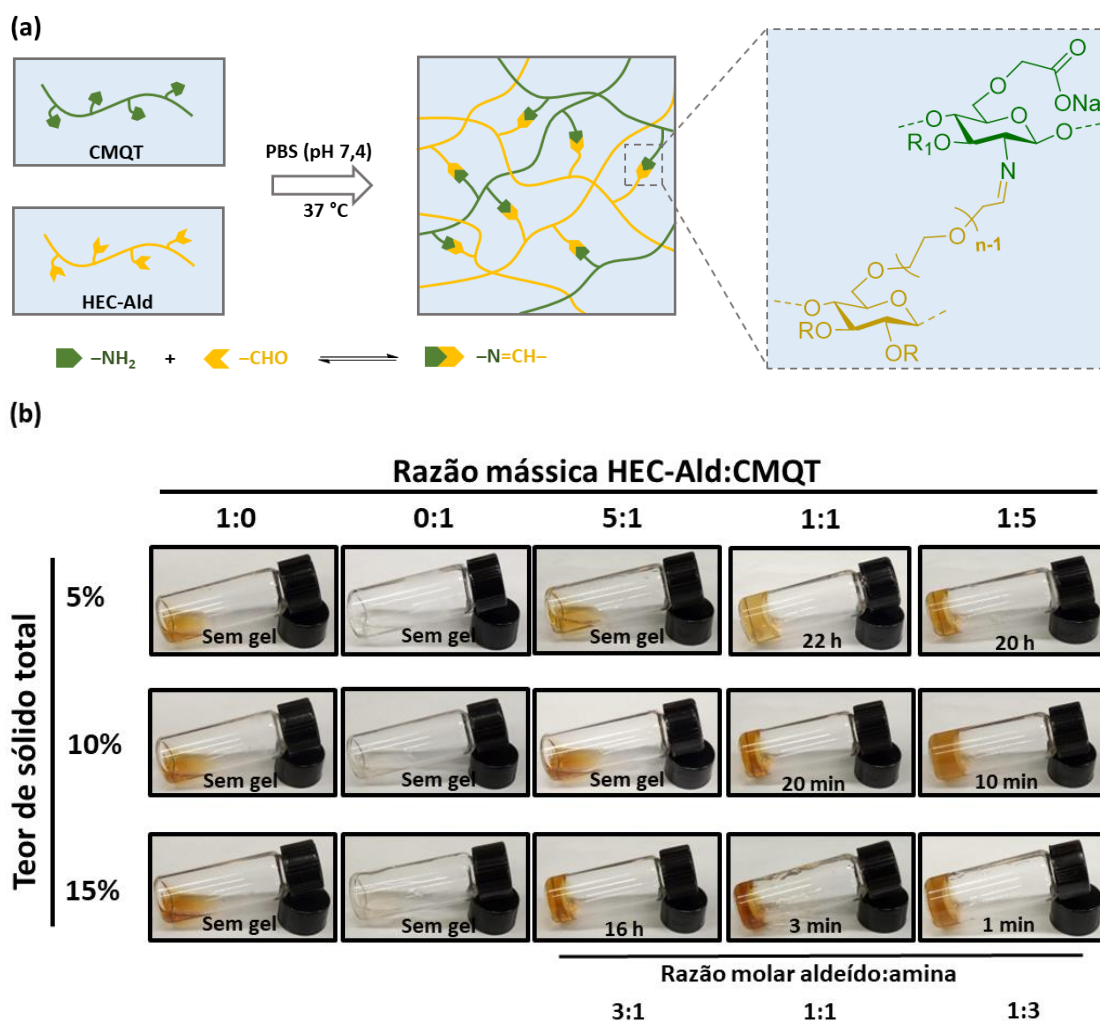


Figura 36. Esquema ilustrativo do processo de preparo do hidrogel HEC-Ald/CMQT (a) e condições experimentais empregadas para o preparo do hidrogel (b). A razão molar aldeído:amina de cada composição foi estimado a partir dos valores do DS(Aldeído) e DS(Amina) (0,12 e 0,38, respectivamente).

Para investigar as hipóteses propostas acima, as influências do teor de sólido total e razão mássica HEC-Ald:CMQT no tempo de gelificação foram investigadas usando PBS (pH 7,4) como solvente. Os resultados experimentais obtidos estão sumarizados na **Figura 36b**. Como esperado, ambas soluções de HEC-Ald e CMQT são necessárias para promover a gelificação delas, independentemente do teor de sólido total da formulação do hidrogel. Ademais, a gelificação das soluções é mais rápida à medida que a proporção de CMQT nas formulações aumenta, enquanto apenas o excesso de HEC-Ald não resultou em uma diminuição do tempo de gelificação. Claramente, a reatividade dos

grupos aldeídos não foi um impedimento para a gelificação. De maneira geral, um excesso de CMQT em relação à quantidade de HEC-Ald reflete em uma maior quantidade de grupos amina em comparação com os grupos aldeído (**Figura 36b**). Esse resultado é consistente com as observações acerca da formação de ligações imina em moléculas pequenas, onde um excesso da amina é necessário para aumentar a eficiência da reação (de Oliveira *et al.*, 2016; Scheller *et al.*, 2015). A gelificação também apresentou uma maior cinética ao passo que o teor de sólido na formulação do hidrogel aumentou de 5% para 15% (m/m), possivelmente por conta do excesso de ligações de hidrogênio e enredamento entre as cadeias polissacarídicas nas soluções concentradas que beneficia a formação das ligações imina e a gelificação (Jiang *et al.*, 2021). Esse fenômeno foi averiguado através do exame da densidade de reticulação dos hidrogéis preparados com diferentes teores de sólido e razão mássica entre a HEC-Ald e CMQT. Neste estudo, a concentração de cadeias elásticas (ν_e^*), isto é, a concentração das cadeias envolvidas nos pontos de reticulação, foi utilizada como medida da densidade de reticulação (Ganguly *et al.*, 2018). O parâmetro ν_e dos hidrogéis foi estimado por meio de análises reológicas, onde amostras dos hidrogéis foram submetidas à uma variação de frequência (0,01–4 Hz) sob grau de cisalhamento constante (1%) e os módulos G' e G'' foram mensurados. Essas curvas podem ser encontradas no **Apêndice C**. Os valores de ν_e foram obtidos pela Eq. (18) (Lin *et al.*, 2010).

$$G'_e = \nu_e^* RT \frac{\langle R^2 \rangle}{\langle R_0^2 \rangle} \quad (18)$$

Na Eq. (18), G'_e corresponde ao módulo de armazenamento (G') no equilíbrio, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura (298,15 K) e $\frac{\langle R^2 \rangle}{\langle R_0^2 \rangle}$ é um parâmetro geométrico que adquire o valor de 1 em hidrogéis recentemente preparados (ou seja, o hidrogel possui uma rede polimérica homogênea) (Lin *et al.*, 2010). Para todos hidrogéis preparados, G' permaneceu constante em toda faixa de frequência investigada, logo, permitindo o seu uso

na Eq. (18). Os valores de ν_e^* calculados estão sumarizados na **Tabela 10** para cada hidrogel e sua respectiva composição.

Tabela 10. Concentração de cadeias elásticas (ν_e) estimadas para os hidrogéis preparados.

Teor total de sólido (% m/m)	Razão mássica HEC-Ald:CMQT (m:m)	Razão molar aldeído:amina	ν_e^* (mol m ⁻³)
5	5:1	3:1	–
	1:1	1:1	10,50 ± 2,21
	1:5	1:3	10,52 ± 4,60
10	5:1	3:1	–
	1:1	1:1	13,30 ± 2,00
	1:5	1:3	15,00 ± 1,00
15	5:1	3:1	15,21 ± 0,15
	1:1	1:1	20,10 ± 4,70
	1:5	1:3	32,37 ± 8,60

Como verificado na **Tabela 10**, a concentração de cadeias elásticas dos hidrogéis aumenta conforme o teor total de sólido e a quantidade de CMQT aumentam na composição do hidrogel. Tendo em vista os resultados obtidos, a solução formulada com um teor total de sólido de 15% (m:m) e uma razão mássica HEC-Ald:CMQT de 1:5 formou um hidrogel em 1 min, sendo este um tempo de gelificação compatível para a formação de hidrogéis *in situ* dentro do corpo humano. Portanto, a cinética de gelificação da solução com essa formulação foi investigada pelo acompanhamento da variação dos módulos G' e G'' em função do tempo. A curva obtida é mostrada na **Figura 37a**.

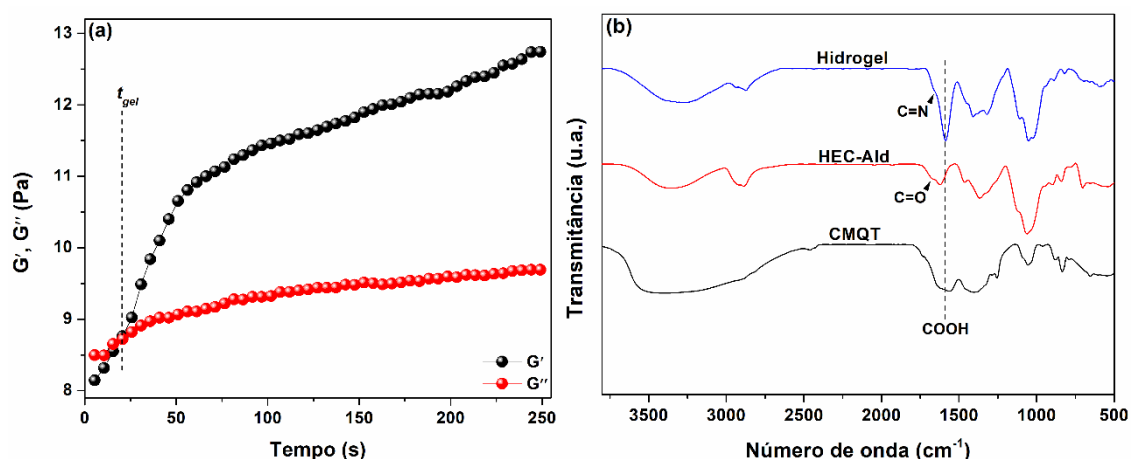


Figura 37. Curva dos módulos G' e G'' em função do tempo da solução precursora do hidrogel HEC-Ald/CMQT (a) e espectros de FTIR do hidrogel, HEC-Ald e CMQT (b).

Como nos Capítulos anteriores desta Tese, o ponto e tempo de gelificação (t_{gel}) da solução foram definidos quando os módulos G' e G'' possuem o mesmo valor ($G' = G''$). Analisando a curva reológica mostrada na **Figura 38a**, é possível observar que a intersecção entre G' e G'' ocorre nos momentos iniciais do experimento, logo, demonstrando a rápida gelificação da solução preparada com um teor total de sólido de 15% (m/m) e uma razão mássica HEC-Ald:CMQT de 1:5. De acordo com os dados experimentais, $t_{gel} = 16$ s. Após t_{gel} , o módulo G' aumenta de valor substancialmente até um aparente estágio de *plateau* devido ao desenvolvimento da rede polimérica reticulada quimicamente. É interessante notar que o t_{gel} obtido pela análise reológica é significativamente menor que o fornecido pelo teste de inversão de tubo (1 min). Essa discrepância ocorre porque, no teste de inversão do tubo, t_{gel} é definido somente após a formação de uma rede polimérica estável que previne o escoamento do gel durante a inversão (Ganguly *et al.*, 2018). Em geral, a rápida gelificação da solução contendo HEC-Ald e CMQT pode ser atribuída à veloz reação entre os grupos aldeídos e amina, como postulado. Ademais, supondo que os grupos aldeídos estão majoritariamente localizados na porção terminal dos grupos hidroxietil, esses grupos funcionais apresentam uma elevada reatividade por conta dos maiores ângulos de aproximação. Desta forma, a reatividade de tais grupos contribui para sua rápida condensação com os grupos amina e formação das ligações imina. Em conjunto, esses fatores culminam em um veloz processo de gelificação. A

técnica de FTIR foi utilizada para comprovar a formação das ligações imina entre HEC-Ald e CMQT. O espectro de FTIR do hidrogel HEC-Ald/CMQT obtido é mostrado na **Figura 37b**, onde é evidente a presença de uma banda em 1657 cm^{-1} atribuída ao estiramento vibracional da ligação C=N, logo, confirmando a formação das ligações imina e a reticulação dos polissacarídeos pelas mesmas (Lee; Shin; Lee, 2019).

O rápido processo de gelificação ($t_{gel} = 16\text{ s}$) do hidrogel preparado com um teor total de sólido de 15% (m/m) e uma razão mássica HEC-Ald:CMQT de 1:5 indica que a solução contendo essa composição pode ser injetada por meio de uma seringa e formar rapidamente um gel no local de aplicação, evitando-se o espalhamento da solução e a lixiviação de compostos biologicamente ativos incorporados. Portanto, a solução contendo essa composição resulta em um hidrogel formado *in situ*, sendo esse o objetivo deste estudo. Por conta dessas características, o hidrogel preparado com essa composição foi selecionado para as próximas análises de caracterização.

5.3.4. Propriedades mecânicas do hidrogel HEC-Ald/CMQT

Como mencionado anteriormente nesta Tese, a investigação das propriedades mecânicas de hidrogéis baseados em polissacarídeos é muito importante por conta de sua influência na habilidade do hidrogel em mimetizar a matriz extracelular e em sua capacidade de dispersar e sustentar as tensões e estresses aos quais os tecidos são submetidos (Liu *et al.*, 2020b). Destarte, as propriedades mecânicas do hidrogel HEC-Ald/CMQT foram investigadas por análises reológicas, as quais foram conduzidas na temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e utilizando amostras do hidrogel preparadas diretamente no reômetro.

Inicialmente, o hidrogel foi submetido a análises reológicas oscilatórias que consistiram na mensuração dos módulos G' e G'' em função da deformação aplicada em uma baixa frequência constante ($0,5\text{ Hz}$). Por meio dessa análise, o regime de viscoelasticidade linear do hidrogel HEC-Ald/CMQT pode ser determinado. A curva relacionando os módulos G' e G'' do hidrogel e a deformação é mostrada na **Figura 38a**. Para a maior parte das deformações aplicadas no hidrogel, o módulo G' permaneceu maior que G'' . No entanto, o

valor de G'' progressivamente aumenta após a deformação de 10%, indicando um aumento do caráter viscoso da amostra, provavelmente, devido à quebra dos pontos de reticulação, os quais consistem em ligações imina, ao passo que o estresse mecânico induzido na matriz polimérica aumenta (CHEN et al., 2020). Eventualmente, G'' ultrapassa G' após a deformação de 250% por conta do colapso da rede polimérica do hidrogel em altas deformações (Dimatteo; Darling; Segura, 2018). Dessa forma, o regime de viscoelasticidade linear do hidrogel preparado encontra-se na faixa de deformação entre 0,1 e 4 Hz. O hidrogel HEC-Ald/CMQT também foi submetido a análises oscilatórias de variação de frequência, onde os módulos G' e G'' da amostra são mensurados em função da frequência. Para essa análise, a amostra do hidrogel foi submetida a diferentes valores de frequência, aplicando-se uma baixa deformação constante (1%). A curva obtida é apresentada na **Figura 38b**, onde é possível constatar que G' é maior que G'' em toda a faixa de frequências investigada. Todavia, em altas frequências ($> 0,4$ Hz), G'' apresenta um leve aumento, ao mesmo tempo em que G' permanece constante. Esse comportamento indica o crescimento do caráter viscoso do hidrogel por causa da quebra dos pontos de reticulação, acarretando a dissipação de energia e um maior G'' (Sánchez-Morán et al., 2019). Todos esses resultados experimentais confirmam a natureza viscoelástica do hidrogel HEC-Ald/CMQT atribuída ao caráter dinâmico das ligações imina que atuam como pontos de reticulação da rede polimérica.

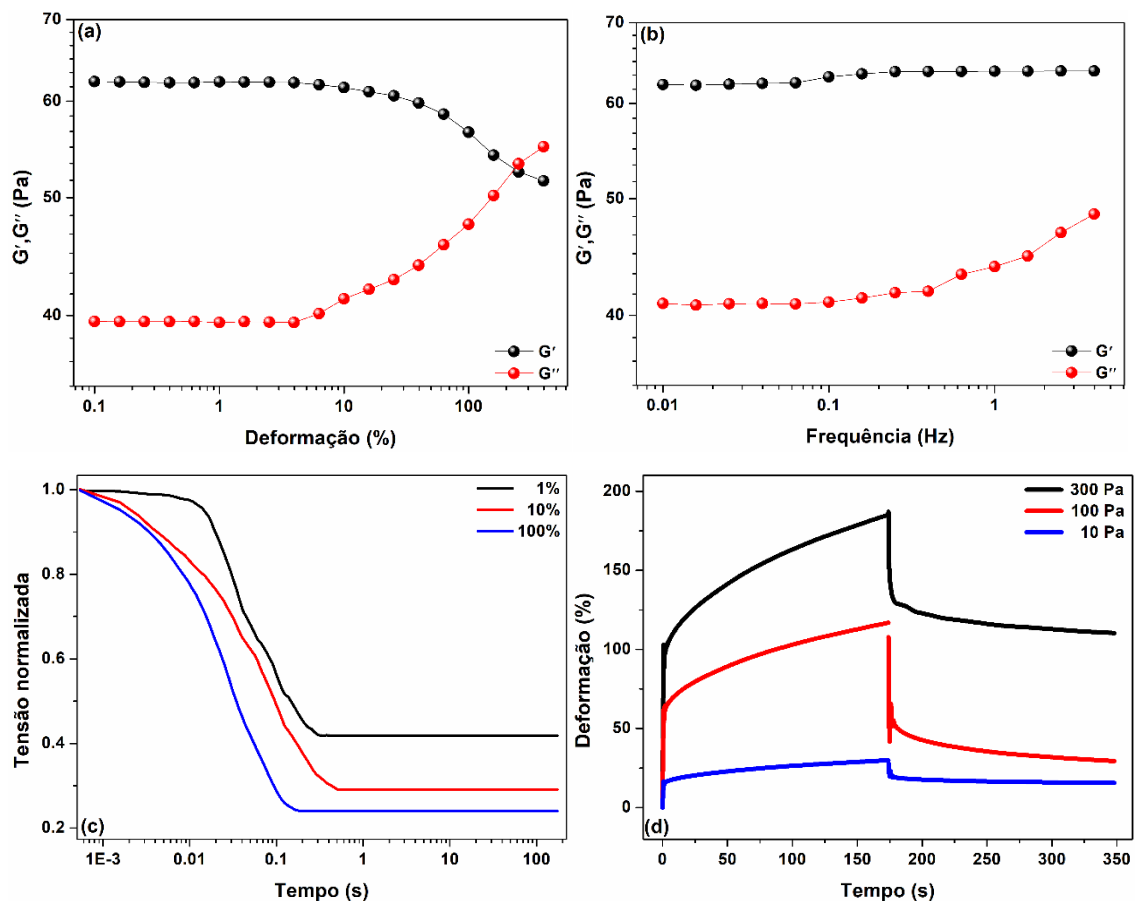


Figura 38. Módulos G' e G'' do hidrogel HEC-Ald/CMQT em função da deformação (a) e frequência (b). Curva de relaxamento de tensão (c) e curvas de fluência-recuperação (d) do hidrogel HEC-Ald/CMQT.

A natureza viscoelástica do hidrogel HEC-Ald/CMQT e o caráter dinâmico das ligações imina garantem que esse material apresente duas propriedades reológicas cruciais aos biomateriais: relaxação de tensão e fluência (Sánchez-Morán *et al.*, 2019). Resumidamente, a relaxação de tensão está relacionada ao fenômeno de dissipação de tensão gerada na matriz polimérica. Por outro lado, fluência é um parâmetro viscoelástico associado com a facilidade a qual a matriz polimérica é deformada sob tensão e sua capacidade de retornar ao estado original quando a fonte da tensão é removida (Bertsch *et al.*, 2022). Essas propriedades são importantes porque células teciduais são capazes de deformar e remodelar plasticamente a matriz extracelular ao redor (Sánchez-Morán *et al.*, 2019). Logo, hidrogéis que não apresentam tais propriedades prejudicam o crescimento das células e suas funções nos tecidos. Consequentemente, a biocompatibilidade do hidrogel é significativamente reduzida na ausência de

relaxação de estresse e fluência (Bertsch *et al.*, 2022). Essas propriedades são facilmente avaliadas por meio de análises reológicas. Para investigar a capacidade de relaxação e dissipação de tensão do hidrogel HEC-Ald/CMQT, a amostra do hidrogel foi submetida à diferentes graus de deformação, que permaneceu constante durante todo experimento. Tipicamente, a deformação imposta na amostra gera uma tensão em sua matriz, a qual é dissipada progressivamente dependendo da natureza viscoelástica da amostra. Portanto, o reômetro registra a variação de tensão, sob deformação constante, em função do tempo. Nesse experimento, a amostra do hidrogel HEC-Ald/CMQT foi submetida às deformações de 1%, 10% e 100%. A tensão foi normalizada pela tensão registrada após o estágio de aumento da deformação (com duração de 8 s) e os resultados obtidos estão descritos na **Figura 38c**. Como observado, a relaxação da tensão induzida foi mais rápida à medida que a deformação aplicada no hidrogel aumentou. Quando o hidrogel é submetido a grandes deformações, as ligações imina, que atuam como pontos de reticulação da matriz polimérica, são eficientemente quebradas e reordenadas. Como consequência, energia e tensão são dissipadas (Zhang, Shuang *et al.*, 2020). Esse comportamento explica o estágio de relaxação postergado observado no hidrogel submetido à mais baixa deformação (1%), onde a dissipação de tensão e reordenação das ligações imina ocorre somente depois do acúmulo de tensão e estresse (Bertsch *et al.*, 2022). Apesar dessas diferenças, o hidrogel apresentou um único estágio de relaxação de tensão em todas as deformações investigadas.

O processo de relaxação de tensão do hidrogel também foi investigado pelo tratamento dos dados experimentais da **Figura 38c** com o modelo geral de Maxwell utilizando apenas um elemento viscoelástico. Para isso, os dados experimentais foram tratados com a seguinte Eq. (19) (Chaudhuri *et al.*, 2016):

$$\frac{\sigma}{\sigma_0} = \alpha e^{-\left(\frac{t}{\tau_r}\right)} \quad (19)$$

onde σ é a tensão registrada no tempo t , σ_0 é a tensão registrada após o estágio de aumento da deformação até o valor alvo, α é um fator pré-exponencial e τ_r é o tempo de relaxação característico (em s). As curvas obtidas a partir da Eq. (19) são apresentadas no **Apêndice C**. Em geral, o modelo de Maxwell com apenas um elemento viscoelástico foi adequado para representar os dados experimentais obtidos em todas as deformações investigadas ($R^2 > 0,990$). De modo geral, esse comportamento está associado com um único evento de relaxamento macromolecular principal. Levando em consideração apenas o hidrogel HEC-Ald/CMQT, esse evento principal é a reorganização das ligações imina e da matriz polimérica para dissipar tensão (Sánchez-Morán *et al.*, 2019). Os tempos de relaxação característica (τ_r), obtidos a partir do Modelo de Maxwell, foram estimados como 0,083, 0,076 e 0,034 s para as deformações 1, 10 e 100%, respectivamente. Aliás, em todas as deformações investigadas, o tempo de dissipação da metade do estresse inicial ($\tau_{0,5}$) foi menor que 1 s. Como é possível observar na **Tabela 11**, a extremamente rápida relaxação de tensão do hidrogel HEC-Ald/CMQT não é comumente observada em hidrogéis constituídos com polissacarídeos. Em especial, hidrogéis reticulados por ligações iminas requerem vários minutos para dissipar o estresse induzido (**Tabela 11**). Portanto, a grande reatividade entre grupos aldeídos e grupos amina não explica a rápida dissipação de tensão do hidrogel HEC-Ald/CMQT. Por outro lado, caso os grupos aldeídos da HEC-Ald estejam localizados majoritariamente na porção terminal dos grupos hidroxietil, esses grupos funcionais possuem grande reatividade e as ligações imina são formadas e quebradas rapidamente. Esses fatores induziriam uma rápida e eficiente dissipação de tensão, como observado para o hidrogel HEC-Ald/CMQT. Os dados experimentais obtidos reforçam essa suposição.

Tabela 11. Tempos de relaxamento observados para diferentes hidrogéis baseados em polissacarídeos.

Hidrogel	Tipo de reticulação	Deformação aplicada	$\tau_{0,5}$	Referência
HEC-Ald/CMQT	Ligação imina	1%, 10% e 100%	0,1 s	<i>Este estudo</i>
Colágeno/nanocristais de celulose-CHO	Ligação imina	1%	40 s	(Zhang, Shuang <i>et al.</i> , 2020)
Colágeno/PEG-CHO	Ligação imina	10%	2 s	(Liu <i>et al.</i> , 2020a)
Goma gelana/ β -ciclodextrina-CHO	Ligação imina	15%	1 min	(Choi <i>et al.</i> , 2022)
Ácido hialurônico-NH ₂ /PEG-CHO	Ligação hidrazona	1%	50 min	(Lou <i>et al.</i> , 2018)
Alginato-CHO reticulado com dihidrazida	Ligação hidrazona	15%	2 min	(Bauer <i>et al.</i> , 2017)
Alginato/PEG-NH ₂	Ligação amida	25%	10 s	(Nam <i>et al.</i> , 2019)
Alginato/Ca ²⁺	Atração eletrostática	15%	2 min	(Bauer <i>et al.</i> , 2017)

Outro importante parâmetro viscoelástico para potenciais biomateriais é sua fluência, o qual pode ser definido como a tendência de um material em sofrer deformação plástica quando submetido à tensão (Chaudhuri *et al.*, 2016). Desta forma, a fluência de um material indica a sua capacidade de remodelação por conta da tensão mecânica oriunda de movimentos celulares (por exemplo, crescimento celular) ou de outras fontes externas. A remodelação da matriz de potenciais biomateriais devido ao estresse mecânico mimetiza o comportamento de diversos tecidos e aumenta sua integração com o corpo humano (Chaudhuri *et al.*, 2016). Com o intuito de analisar essa propriedade viscoelástica, o hidrogel HEC-Ald/CMQT foi submetido aos experimentos de fluência-recuperação. Nesses experimentos, a deformação induzida na amostra é mensurada durante a aplicação de uma tensão constante por um intervalo de tempo e depois da retirada da fonte de tensão no estágio de recuperação (Chaudhuri *et al.*, 2016). Nesse tipo de experimento, recuperação é relacionada ao retorno da amostra

para suas dimensões originais anteriores à aplicação da tensão, logo, no estágio de recuperação, a deformação mensurada diminui ((Sánchez-Morán *et al.*, 2019). Por conta da eficiente dissipação de tensão, o hidrogel HEC-Ald/CMQT, supostamente, apresentará uma baixa tendência de recuperação depois da retirada da tensão por causa da quebra e reorganização das ligações imina para dissipar a tensão induzida na matriz polimérica. As tensões de 10, 100 e 300 Pa foram aplicadas na amostra do hidrogel HEC-Ald/CMQT e a deformação induzida foi acompanhada pelo reômetro. As curvas obtidas são mostradas na **Figura 38d**. Quando submetido aos diferentes valores de tensão, o hidrogel HEC-Ald/CMQT foi instantaneamente deformado e a deformação induzida aumenta ao passo que a tensão aplicada aumenta, provavelmente, devido a grande quantidade de ligações imina quebradas e refeitas nessas condições. Após a retirada da tensão aplicada, o hidrogel não apresentou uma recuperação significativa, como indicado pela baixa deformação observada, em virtude da eficiente reorganização da matriz polimérica. Todos os resultados experimentais dos experimentos de dissipação de tensão e fluência-recuperação demonstram que o hidrogel HEC-Ald/CMQT preparado possui interessantes propriedades viscoelásticas que mimetizam a matriz extracelular natural e potencialmente aumentam a biocompatibilidade do hidrogel com muitos tecidos do corpo humano (Chaudhuri *et al.*, 2016; Sánchez-Morán *et al.*, 2019).

5.3.5. Injetabilidade e *self-healing* do hidrogel

Como discutido anteriormente neste Capítulo, hidrogéis formados *in situ* são materiais muito atrativos para a liberação controlada de fármacos, pois, permitem a liberação local do fármaco encapsulado utilizando uma rota de administração pouco invasiva (injeção). Nesse sentido, a rápida gelificação da solução precursora no local de aplicação é crucial. Para investigar essa potencial aplicação do hidrogel HEC-Ald/CMQT, a gelificação *in situ* da solução precursora desse material foi qualitativamente avaliada. Para isso, volumes iguais das soluções de HEC-Ald e CMQT foram individualmente carregadas no dispositivo de injeção mostrado na **Figura 39a**. O dispositivo de injeção é formado por uma seringa de compartimento duplo contendo uma ponteira misturada, a qual possui uma agulha 20 G (diâmetro interno de 0,90 mm) adaptada em sua porção final.

Para facilitar a visualização do hidrogel formado, uma pequena quantidade de corante azul (Cibacron Blue 3G-A) foi adicionado na solução da HEC-Ald. Mediante pressão no êmbolo do dispositivo de injeção, as soluções dos polissacarídeos são extrusadas através da ponteira misturadora e agulha, gelificando posteriormente em água na temperatura de 37 °C. A **Figura 39b** apresenta esse processo de extrusão e gelificação. A **Figuras 39c** mostra que, depois de formado, o hidrogel HEC-Ald/CMQT pode ainda ser manipulado. As soluções de HEC-ALd e CMQT também gelificam quando aplicadas diretamente sobre uma membrana de colágeno em “condições secas” e “condições úmidas”, como mostrado nas **Figuras 39d e 39e**, respectivamente. Depois de formado, o hidrogel apresenta uma forte adesão às membranas. Portanto, todos esses resultados demonstram que a soluções de HEC-Ald e CMQT, quando misturadas, gelificam rapidamente e resultam em um hidrogel estável. Essas características indicam que o hidrogel formado pela mistura dessas soluções pode ser formado *in situ* em uma região específica do corpo humano e, assim, o hidrogel pode atuar como dispositivo de liberação local de um fármaco encapsulado.

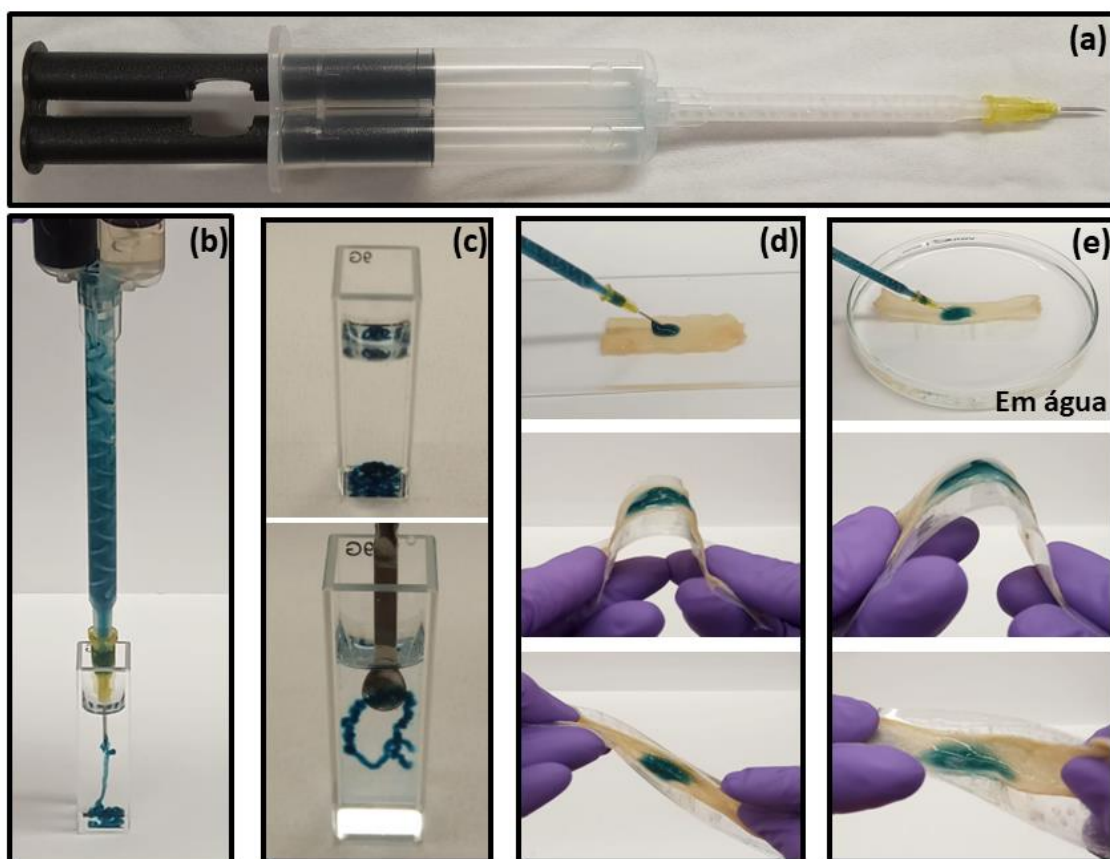


Figura 39. Fotografias dos testes qualitativos para demonstrar a gelificação *in situ* do hidrogel HEC-Ald/CMQT. Sistema de injeção utilizado (a) para promover a extrusão das soluções dos polissacarídeos em água na temperatura de 37 °C (b,c). O hidrogel também foi formado diretamente em membranas de colágeno em condições “secas” (d) e “úmidas” (e).

A matriz polimérica do hidrogel HEC-Ald/CMQT é formada pelas cadeias dos polissacarídeos quimicamente reticuladas por ligações imina. Por conta da natureza dinâmica das ligações imina, o hidrogel preparado possui uma propriedade de “autorreparação”, comumente denominada de *self-healing*, a qual consiste na reparação da matriz polimérica após algum tipo de dano. Essa propriedade do hidrogel HEC-Ald/CMQT foi verificada visualmente, como mostrado na **Figura 40**. Para isso, amostras do hidrogel (uma contendo um corante azul) foram preparadas, cortadas e mantidas em contato sem nenhum tipo de ação externa. A adesão das amostras ocorre instantaneamente na interface de contato e as amostras são fundidas em uma única peça de hidrogel, que pode ser levantada e esticada sem sofrer dano (**Figura 40**). Esse resultado

demonstra claramente a rápida cinética de quebra e reforma das ligações imina que constituem a matriz do hidrogel HEC-Ald/CMQT.

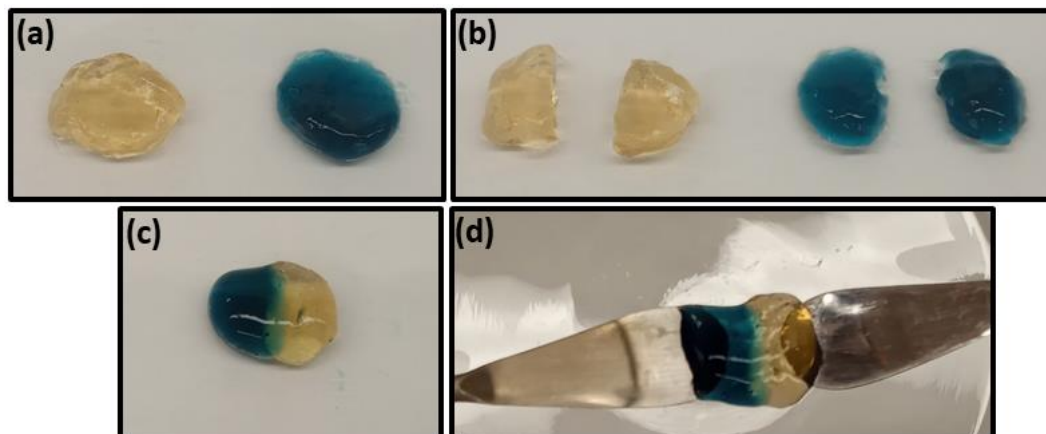


Figura 40. Capacidade de autorreparação (*self-healing*) do hidrogel HEC-Ald/CMQT, onde amostras do hidrogel foram preparadas (a), cortadas (b) e colocada em contato (c). Imediatamente, adesão ocorre entre as amostras na interface de contato e as amostras são fundidas em uma única peça posteriormente (d).

A capacidade de *self-healing* (ou seja, “autorreparação”) do hidrogel foi avaliada por meio de análises reológicas com variação da deformação aplicada na amostra do hidrogel. Nessa análise, aplica-se ao hidrogel diferentes deformações durante um intervalo de tempo e os módulos G' e G'' são mensurados. As curvas obtidas estão apresentadas na **Figura 41**. O hidrogel foi submetido a uma variação sequencial de deformação de 1% até 250% em segmentos de 3 min. Na baixa deformação de 1%, G' é maior que G'' , indicando que a amostra está no estado gel. O aumento da deformação para 250% resulta no crescimento de G'' e em sua ultrapassagem por G' , indicando a ruptura da matriz do hidrogel e o aumento do caráter viscoso. Retornando a deformação aplicada para 1%, os módulos G' e G'' retornam para seus valores originais imediatamente, sugerindo a rápida reforma das ligações imina e da matriz polimérica do hidrogel. Esse mesmo ciclo de variação de deformação foi repetido mais duas vezes e os mesmos resultados foram obtidos. Todos os resultados obtidos, considerando os testes qualitativos e quantitativos, confirmam a capacidade de autorreparação do hidrogel HEC-Ald/CMQT preparado.

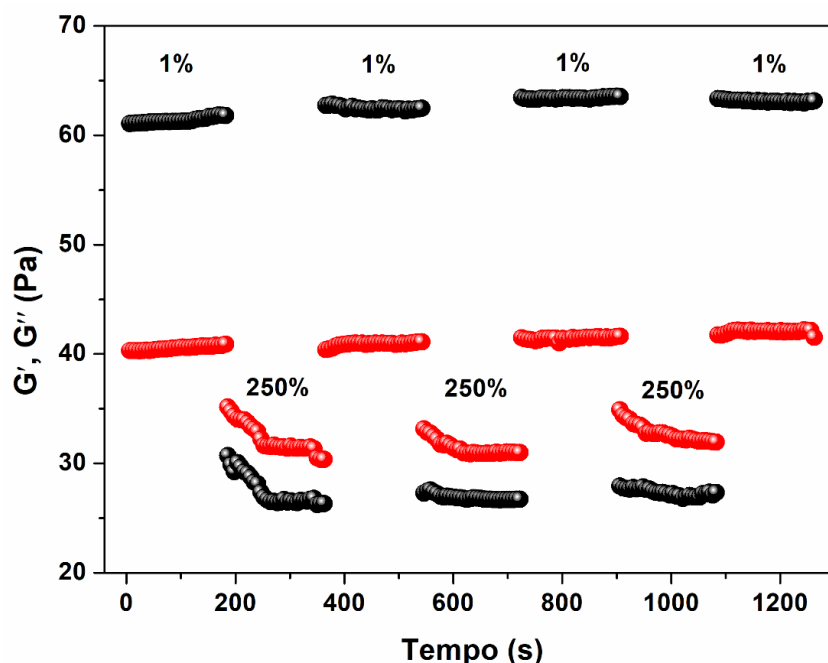


Figura 41. Curvas de variação da deformação do hidrogel HEC-Ald/CMQT, onde a deformação de 1% até 250% em intervalos de 3 min.

5.3.6. Intumescimento e perda de massa do hidrogel HEC-Ald/CMQT

A capacidade de intumescimento do hidrogel preparado também foi investigada. Levando em consideração o uso do hidrogel como dispositivo de liberação de fármacos, a sua capacidade de intumescer em específicas condições de pH é uma atrativa característica, haja visto que tecidos com regiões lesionadas ou tumorais apresentam diferentes condições de pH que podem variar de extremamente ácidas até alcalinas (Yin *et al.*, 2022a). Portanto, o efeito do pH no intumescimento do hidrogel HEC-Ald/CMQT foi avaliado na temperatura de 37 °C utilizando soluções com pH 1,2, pH 5,2 e pH 7,4, os quais refletem a extensa faixa de pH encontrada em sítios tumorais e em diferentes lesões (Cao, Yu *et al.*, 2019c). Os resultados obtidos são apresentados na **Figura 42a**. Como é possível verificar, o intumescimento do hidrogel foi maior e mais rápido ao passo que o pH do meio diminuiu. Após 180 min do início dos experimentos, o hidrogel atingiu um intumescimento máximo de 107% no pH 7,4, 162% no pH 5,2 e 265% no pH 1,2. Esse comportamento está associado com a rápida hidrólise (e quebra)

das ligações imina em condições ácidas (Chen, Junyi *et al.*, 2020c). Como resultado, a densidade de reticulação da matriz polimérica diminui e a matriz polimérica é capaz de expandir. Isto possibilita um maior influxo de líquido para o interior do hidrogel e o intumescimento máximo do hidrogel aumenta. Além disso, em condições ácidas, os grupos amina livres da CMQT estão completamente protonados por conta de seu pK_a próximo ao valor de 6,2 (Yin *et al.*, 2022b). Nessa condição, a repulsão cátion-cátion, que facilita a expansão da matriz polimérica, também é um fator contribuinte para o maior intumescimento do hidrogel HEC-Ald/CMQT observado com o decréscimo do pH do meio.

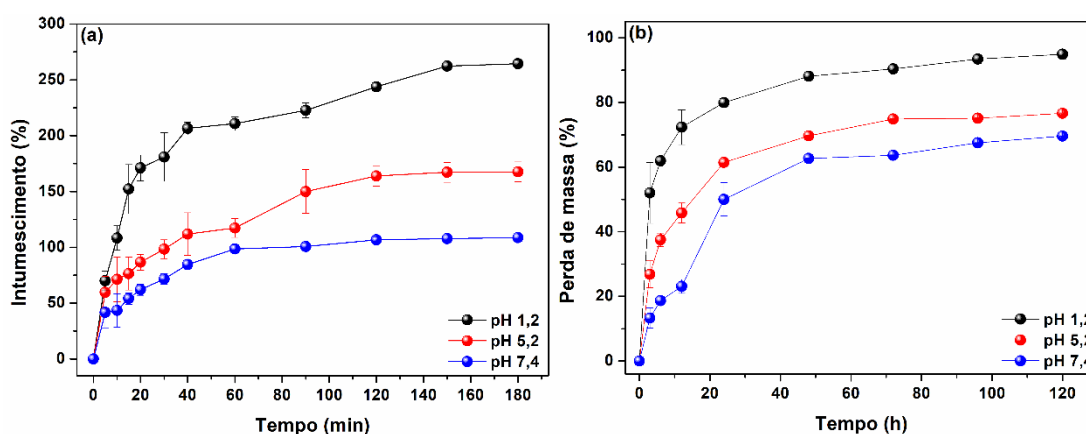


Figura 42. Intumescimento (a) e perda de massa (b) do hidrogel HEC-Ald/CMQT em diferentes condições de pH. Os experimentos foram realizados na temperatura de 37 °C.

A estabilidade do hidrogel HEC-Ald/CMQT foi investigada através da mensuração da perda de massa do hidrogel incubado nos meios com pH 1,2, pH 5,2 e pH 7,4. Os resultados desses experimentos são apresentados na **Figura 42b**. O hidrogel apresentou uma maior (e mais rápida) perda de massa à medida que o pH do meio de incubação diminuiu de pH 7,4 para pH 1,2. Novamente, esse comportamento ocorre por conta da hidrólise das ligações imina em condições ácidas de pH. Isso resulta na difusão das cadeias polissacarídicas “livres” (ou seja, não reticuladas) para fora da matriz polimérica e na perda de massa observada para o hidrogel em condições ácidas. Ao final dos experimentos, o hidrogel apresentou uma perda maior que 95% do seu peso inicial em pH 1,2, enquanto apenas 69% em pH 7,4. Em conjunto, os resultados

obtidos dos experimentos de intumescimento e perda de massa demonstram o comportamento responsivo ao pH do hidrogel HEC-Ald/CMQT, o qual pode ser muito útil para promover a liberação controlada de fármacos utilizando o pH como força motriz do processo de liberação.

5.3.7. Ensaios de liberação *in vitro*

A potencial aplicação do hidrogel HEC-Ald/CMQT como dispositivo de liberação controlada de fármacos também foi investigada. Para isso, vanilina (VN) foi encapsulada no hidrogel e sua liberação foi avaliada. VN foi utilizada como molécula modelo por causa de sua intensa absorção no espectro UV-Vis da luz que acarreta uma fácil quantificação. Não obstante, VN apresenta várias interessantes propriedades biológicas, incluindo atividade anticâncer, antiviral e antioxidante (Arya *et al.*, 2021). O hidrogel HEC-Ald/CMQT contendo VN foi preparado pela simples adição do composto biológico na solução de HEC-Ald antes da gelificação com CMQT. É importante mencionar que VN possui um grupo aldeído em sua estrutura capaz de reagir com os grupos amina da CMQT e potencialmente afetar a gelificação. Aparentemente, a presença de VN não afetou a eficiência do processo de gelificação, o qual ocorreu em, aproximadamente, 1 min. A densidade de reticulação do hidrogel contendo VN ($23,90 \pm 1,20 \cdot 10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$; determinada por reologia em diferentes frequências) é similar com a densidade do hidrogel que não contém VN ($24,37 \pm 1,30 \cdot 10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$). A ausência de um grande impacto da presença da VN na gelificação pode ser um resultado de sua baixa quantidade em comparação com os polissacarídeos (5% em relação a massa combinada de HEC-Ald e CMQT). Outra possibilidade é a ionização da VN ($pK_a \sim 7,4$) em PBS (pH 7,4), o qual foi utilizado para o preparo do hidrogel, que diminui a eletrofilicidade de seu grupo aldeído e reduz sua reatividade com os grupos amina da CMQT. Neste estudo, a liberação de VN do hidrogel HEC-Ald/CMQT foi investigada em pH 1,2, pH 5,2 e pH 7,4, os quais refletem a faixa de pH observada em tecidos com lesões/tumores (pH ácido) e tecidos saudáveis (pH alcalino). Os experimentos foram realizados na temperatura de 37 °C e os resultados são apresentados na **Figura 43**.

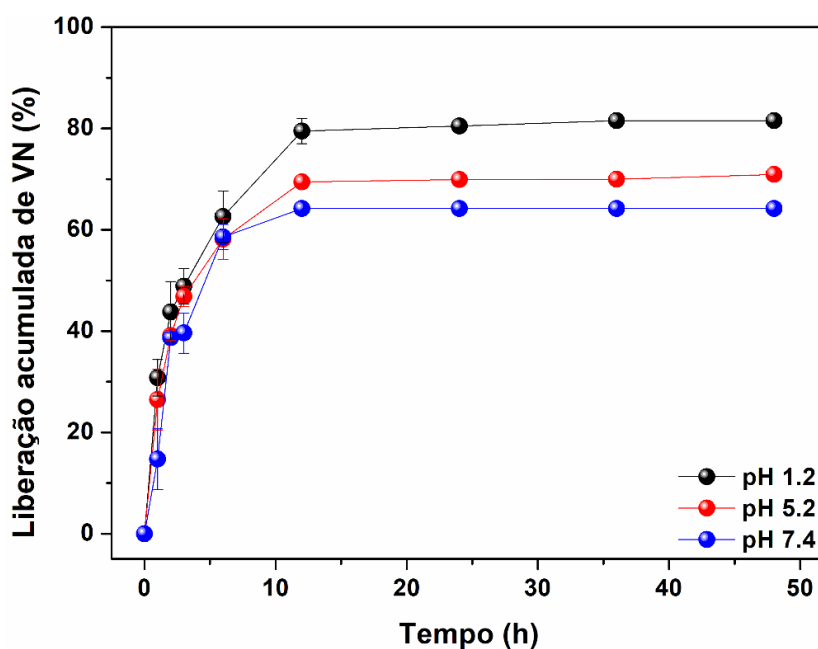


Figura 43. Curvas de liberação da VN do hidrogel HEC-Ald/CMQT em meio tampão com pH 1,2, pH 5,2 e pH 7,4. Os experimentos de liberação foram realizados na temperatura de 37 °C.

Como é possível observar na **Figura 43**, a liberação de VN do hidrogel HEC-Ald/CMQT foi rápida em todas as condições de pH investigadas. Provavelmente, essa rápida liberação nos estágios iniciais dos experimentos está associada com a lixiviação das moléculas de VN na superfície da amostra do hidrogel (Pertici *et al.*, 2019). Após 12 h do início dos experimentos, um estágio de equilíbrio é atingido, onde fica evidente que a liberação de VN é maior em pH 1,2 (82%), seguido pelo pH 5,2 (71%) e pH 7,4 (63%). Obviamente, a maior liberação de VN em condições de pH mais ácidas é por conta da quebra dos pontos de reticulação da matriz polimérica, os quais são baseados em ligações iminas que são facilmente hidrolisadas em pH ácido. Como resultado, a matriz polimérica é degradada e as moléculas de VN são lixiviadas para fora do hidrogel preparado. Para avaliar o perfil de liberação da VN do hidrogel HEC-Ald/CMQT é importante verificar e entender o mecanismo pelo qual ela é liberada. Neste estudo, a liberação de VN a partir do hidrogel HEC-Ald/CMQT foi tratada como um fenômeno de partição (Reis *et al.*, 2007). De maneira geral, o fenômeno de partição é baseado na distribuição do soluto entre a matriz polimérica e o solvente (meio de liberação), e que a afinidade físico-química entre as espécies

soluto/matriz e soluto/solvente está relacionada com a velocidade de liberação do soluto (Reis *et al.*, 2007). Nesse caso, o processo de liberação da VN é dependente de seu parâmetro de atividade de partição (α). Esse parâmetro representa a afinidade da VN com as fases matriz polimérica ou solvente (Reis2007). De acordo com o modelo citado, a liberação da VN depende da atividade de partição α da VN e de suas frações liberadas em um intervalo de tempo (F_R) e no equilíbrio ($F_{m\acute{a}x}$). Esses dois últimos parâmetros podem ser determinados diretamente a partir dos dados de liberação da VN (Fajardo *et al.*, 2013a). Por outro lado, o parâmetro α é calculado pela seguinte Eq. (20) (Reis *et al.*, 2007):

$$\alpha = \frac{F_{max}}{1 - F_{max}} \quad (20)$$

Como mencionado anteriormente, α expressa a afinidade da VN com a matriz polimérica do hidrogel ou com o meio de liberação. Portanto, o valor de α descreve a existência, ou não, de difusão da VN entre as fases. Para $\alpha = 0$, a difusão do soluto para o solvente não é favorável e a liberação de VN do hidrogel para o meio não ocorre. Contudo, se $\alpha > 0$, a difusão de VN e sua liberação são favoráveis (Reis *et al.*, 2007). Com base nos valores de F_R e $F_{m\acute{a}x}$ de VN liberada do hidrogel HEC-Ald/CMQT, os dados de liberação descritos na **Figura 43** foram tratados com os modelos de partição de primeira ordem (Eq. (21) e segunda ordem (Eq. (22)), com caráter reversível. Esses modelos predizem todo o processo de liberação de VN do hidrogel (Reis *et al.*, 2007).

$$F_R = F_{m\acute{a}x} \left(1 - e^{-\left(\frac{k_1}{F_{m\acute{a}x}}\right)t} \right) \quad (21)$$

$$F_R = \frac{F_{m\acute{a}x} \left(e^{2\left(\frac{k_2}{\alpha}\right)t} - 1 \right)}{1 - 2F_{m\acute{a}x} + e^{2\left(\frac{k_2}{\alpha}\right)t}} \quad (22)$$

Nessas equações, k_1 e k_2 são as constantes cinéticas de primeira e segunda-ordem, respectivamente. Essas constantes são obtidas a partir do *plot* não-linear das Eq. (21) e Eq. (22). Todos os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a liberação de VN do hidrogel HEC-Ald/CMQT nas condições de pH testadas estão sumarizados na **Tabela 12**.

Tabela 12. Parâmetros cinéticos da liberação de VN do hidrogel HEC-Ald/CMQT.

pH	α	Primeira ordem		Segunda ordem	
		$k_1 (\times 10^{-4} \text{ h}^{-1})$	R^2	$k_2 (\times 10^{-4} \text{ h}^{-1})$	R^2
1,2	4,53	$28,00 \pm 0,29$	0,973	$49,40 \pm 0,10$	0,991
5,2	2,33	$27,33 \pm 0,60$	0,980	$41,83 \pm 0,05$	0,995
7,4	1,77	$23,25 \pm 0,01$	0,984	$20,68 \pm 0,07$	0,990

Em todas as condições de pH testadas, a liberação de VN é mais bem descrita pelo modelo cinético reversível de segunda-ordem, haja visto que os valores de R^2 para esse modelo são maiores do que aqueles observados para o modelo de primeira-ordem. Esse resultado indica que a liberação de VN do hidrogel ocorre pela combinação de difusão de Fick e relaxação da matriz polimérica, incluindo intumescimento, expansão da matriz polimérica e degradação do hidrogel (de Freitas *et al.*, 2020). Analisando os dados cinéticos apresentados na **Tabela 12**, é possível perceber que os valores das constantes de segunda-ordem aumentam à medida que o pH do meio de liberação diminui, indicando que a liberação de VN é mais rápida nessas condições. Ao mesmo tempo, os valores de α também aumentam com a diminuição do pH do meio de liberação. Esse comportamento aponta a maior afinidade da VN pelo meio de liberação (solvente) em pH ácido. Em condições ácidas de pH, o hidrogel expande e degrada rapidamente. Consequentemente, as moléculas de VN difundem para fora da matriz polimérica (Fajardo *et al.*, 2013b). É importante mencionar que os contra-íons do meio de liberação também influenciam a liberação de VN por conta de sua influência na conformação das cadeias poliméricas, porém o efeito do pH é mais preponderante (Duceac *et al.*, 2021;

Zhou *et al.*, 2023). Todos esses resultados confirmam que o hidrogel HEC-Ald/CMQT é capaz de controlar a liberação de fármacos de acordo com o pH do meio.

5.3.8. Ensaio de viabilidade celular

Materiais poliméricos para o uso em seres humanos, como é o caso de hidrogéis formados *in situ*, não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente em tratamento (Dimatteo; Darling; Segura, 2018). Para investigar preliminarmente a citotoxicidade do hidrogel HEC-Ald/CMQT, ensaios de viabilidade celular foram realizados com esse material. Nesses experimentos, as células HB4a (células mamárias) foram selecionadas como células modelo, sendo incubadas em um meio de cultura contendo uma amostra do hidrogel. A viabilidade celular dessas células após o tratamento com o hidrogel foi realizada por meio do teste indireto empregando MTT, onde esse composto é absorvido pelas células e convertido a formazan (Van De Loosdrecht *et al.*, 1994). Formazan é uma molécula cromogênica que absorve luz visível no comprimento de onda de 540 nm e sua concentração é proporcional com a quantidade de células vivas. Dessa forma, a mensuração da densidade óptica em 540 nm pode ser utilizado para determinação da viabilidade celular (Van De Loosdrecht *et al.*, 1994). Logo, uma maior densidade óptica indica uma grande quantidade de células vivas e, por conseguinte, uma maior viabilidade celular. É importante mencionar que o objetivo desses experimentos é avaliar preliminarmente a toxicidade do hidrogel HEC-Ald/CMQT. Por conta disso, a toxicidade dos polímeros precursores (HEC-Ald e CMQT) não foi avaliada neste estudo. As células foram tratadas com duas concentrações do hidrogel HEC-Ald/CMQT (0,01 e 0,1 mg mL⁻¹) e um experimento controle (sem hidrogel) foi realizado. Os resultados da viabilidade celular desses experimentos são apresentados na **Figura 44**. Sucintamente, a densidade óptica das células tratadas com o hidrogel (independentemente de sua concentração) é praticamente a mesma que o teste controle. Portanto, esses resultados indicam que o hidrogel não induziu a morte das células nas condições experimentais testadas, sugerindo a ausência de toxicidade. Apesar desses resultados promissores, outros ensaios de viabilidade celular empregando diferentes linhagens de célula e experimentos *in vivo* são

cruciais para verificar completamente a biocompatibilidade do hidrogel HEC-Ald/CMQT (Williams, 2022).

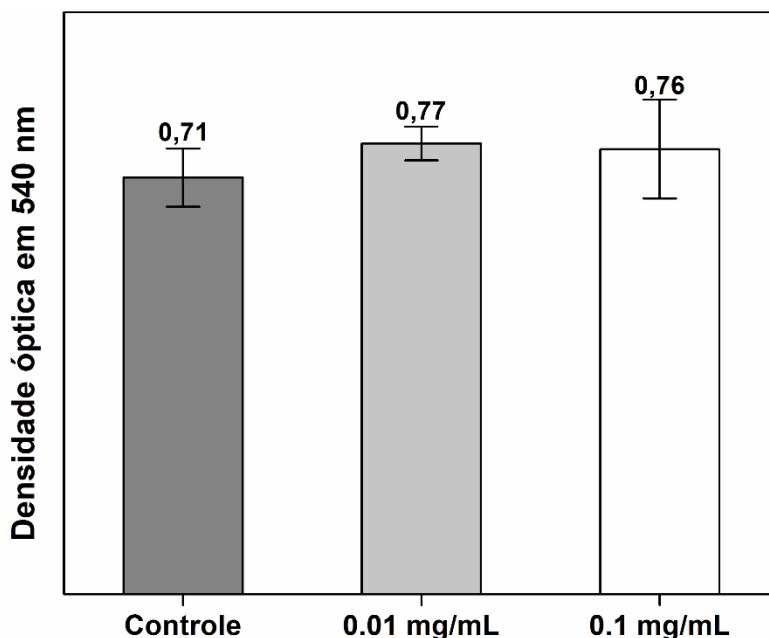


Figura 44. Ensaio de viabilidade celular com diferentes concentrações do hidrogel HEC-Ald/CMQT.

5.4. Conclusão

Neste Capítulo, um hidrogel formado *in situ* foi preparado a partir da reticulação química entre carboximetil quitosana (CMQT) e hidroxietil celulose funcionalizada com grupos aldeído (HEC-Ald), a qual foi baseada na formação de ligações imina entre as cadeias desses polissacarídeos. Neste estudo, os grupos aldeídos foram introduzidos na estrutura da HEC por meio de uma reação de funcionalização baseada em dois passos distintos: introdução de grupos acetal e a subsequente desproteção ácida desses grupos, “desmascarando” os aldeídos. Por meio desse procedimento, a destruição da unidade sacarídica da HEC foi evitada, como também, a redução massiva de seu peso molecular e grau de 4olimerização. O hidrogel preparado exibiu interessantes propriedades como, por exemplo, um rápido relaxamento de estresse, fluência e *self-healing*. A rápida gelificação da solução precursora do hidrogel sugere que o hidrogel pode ser formado *in situ*, em qualquer parte do corpo humano, e atuar como

dispositivo de liberação local de fármacos. De fato, o hidrogel preparado foi capaz de controlar a liberação do fármaco modelo vanilina de acordo com o pH do meio de liberação. Como verificado, uma grande quantidade de vanilina é liberada do hidrogel em pH ácido, uma condição de pH comumente encontrada em tecidos com tumores e diferentes tipos de lesões. Esses resultados, aliados com sua baixa toxicidade, indicam que o hidrogel preparado pode atuar como um potencial dispositivo de liberação controlada de fármacos sensível ao pH.

Capítulo 6 – Hidrogéis preparados por complexação polieletrólítica utilizando um método de semidissolução/acidificação: Síntese, caracterização e aplicação na liberação de fármacos

6.1. Introdução

Hidrogéis baseados em polissacarídeos formados por complexação polieletrólítica são interessantes materiais fisicamente reticulados para diversas aplicações biomédicas porque seu preparo não requer o uso de reticulantes químicos e, em muitos casos, os polissacarídeos não precisam ser funcionalizados quimicamente (Zhang, Junmei Zhi Junji *et al.*, 2019). Dentre os polissacarídeos usados com grande frequência no preparo de complexos polieletrólíticos (PEC), encontra-se a QT, a qual possui uma alta densidade de cargas positivas quando os seus grupos amina ($-NH_2$) são ionizados em meio ácido, logo, podendo formar PECs na presença polissacarídeos contendo grupos iônicos, como a Pct. Portanto, os polissacarídeos QT e Pct podem ser utilizados no preparo de um hidrogel por meio de uma rota de reticulação física por complexação polieletrólítica. De maneira geral, o método mais comum para o preparo desses materiais é baseado na simples mistura das soluções dos polissacarídeos. Conforme mencionado no Capítulo 2, esse procedimento raramente resulta em um material com uma estrutura macroscopicamente uniforme por conta da rápida complexação dos polissacarídeos na interface de contato entre as soluções e a formação de coacervados, os quais são condensados posteriormente (Murakawa *et al.*, 2019). Como resultado, esses materiais geralmente apresentam uma grande heterogeneidade estrutural e propriedades mecânicas insatisfatórias (por exemplo, elevada fragilidade, baixa extensibilidade e resiliência e baixa estabilidade mecânica) (Ramin *et al.*, 2019). Essas características limitam a aplicação desse tipo de hidrogel como potencial biomaterial, incluindo como sistema de liberação controlada de compostos biologicamente ativos (Liu *et al.*, 2018).

Para contornar essas limitações, diferentes estratégias são exploradas para o preparo de PECs contendo polissacarídeos (Murakawa *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2018). Processamento termomecânico e separação de fase em não-solventes são alguns exemplos de metodologias investigadas para o preparo de PECs; entretanto, a degradação dos polissacarídeos utilizados durante a etapa de mistura é um fator limitante desses métodos (Baig *et al.*, 2020; Chen, Pei *et al.*, 2020). Outro método empregado envolve o uso de líquidos iônicos como solvente da solução dos polissacarídeos (Nunes *et al.*, 2017). Nesse sistema, os polissacarídeos são eficientemente solubilizados e as interações eletrostáticas entre os grupos carregados são maximizadas, permitindo, assim, a obtenção de materiais mecanicamente estáveis (Nunes *et al.*, 2017). Porém, líquidos iônicos são caros (de Jesus; Maciel Filho, 2022). Considerando todos esses aspectos, neste Capítulo é descrito o uso de um novo método de semidissolução/acidificação para a obtenção de hidrogéis preparados por complexação polieletrólítica entre os polissacarídeos QT e Pct. De maneira geral, esse método aproveita a restrita solubilidade da QT em água, onde esse polissacarídeo somente é solúvel na presença de uma pequena quantidade de ácido. Dessa forma, o método empregado aqui é baseado na dispersão completa da QT (na forma sólida) em uma solução de Pct. Nesse caso, a viscosidade da solução de Pct preparada foi capaz de estabilizar a dispersão da QT. Posteriormente, a mistura formada foi acidificada em uma atmosfera de ácido acético gasoso. O vapor de ácido acético difunde lentamente na mistura e gradualmente dissolve a QT por conta da protonação dos grupos amina, que complexa com a Pct e resulta no PEC.

Tendo em vista essas considerações, a ideia principal apresentada neste Capítulo é que o método de semidissolução/acidificação, por ser um processo lento e termodinamicamente favorável, evita a extensa formação de agregados heterogêneos. Assim, o método descrito resulta na formação de um hidrogel com uma estrutura uniforme e, *a priori*, estável. Para confirmar essa hipótese, uma série de experimentos envolvendo o preparo dos hidrogéis pelos dois processos de complexação polieletrólítica (semidissolução/acidificação e convencional) foi realizada, efetuando-se, em seguida, as respectivas caracterizações e investigações à cerca dos aspectos estruturais e da estabilidade desses

materiais. Pela primeira vez, uma comparação entre esses dois processos de complexação polieletrólítica é relatada. Por fim, a potencial aplicação dos hidrogéis preparados como sistemas de liberação controlada de curcumina (CUR) foi investigada. A CUR é um pigmento amarelo extraído de fontes vegetais que possui interessantes propriedades biológicas, como, por exemplo, atividade anticancerígena, antifúngica e bactericida (Dev *et al.*, 2016). De maneira geral, este estudo demonstra as propriedades intrínsecas dos hidrogéis obtidos pela complexação polieletrólítica usando o método de semidissolução/acidificação e seus benefícios em relação aos materiais obtidos pelo método convencional de mistura das soluções dos polissacarídeos.

6.2. Experimental

6.2.1. Materiais

A QT e a Pct utilizadas foram obtidas e preparadas conforme detalhado nos Capítulos 2 e 3, respectivamente. Ácido acético e hidróxido de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Curcumina (Cur) foi adquirida da Sigma-Aldrich (EUA). Com exceção da QT e Pct, todos os outros reagentes são de grau analítico. Ainda, a quantidade de grupos amina livres na estrutura da QT foi estimada utilizando o método desenvolvido por PROCHZKOVA *et al.* (1999). Por esse método, a quantidade de grupos amina na QT utilizada para o preparo dos hidrogéis é $22,00 \pm 3.21 \mu\text{mol g}^{-1}$. A quantidade de grupos carboxila da Pct foi calculada como $80.00 \pm 15.91 \mu\text{mol g}^{-1}$ por meio da metodologia desenvolvida por Yu *et al.* (2021).

6.2.2. Preparo dos hidrogéis fisicamente reticulados

Os hidrogéis formados pela complexação polieletrólítica entre QT e Pct foram preparados pelo método de semidissolução/acidificação. Para isso, certa quantidade de Pct foi solubilizada em água destilada (50 mL) sob agitação mecânica a temperatura ambiente para formar uma solução homogênea. O pH dessa solução foi ajustado para pH 6 pela adição de uma solução aquosa de NaOH (1 mol L^{-1} , 1 mL). Posteriormente, diferentes quantidades de QT foram adicionadas na solução de Pct para formar misturas heterogêneas (e, subsequentemente, os hidrogéis) com diferentes razões de massa entre QT e Pct. Após a adição da QT, o pH da solução não variou significativamente (pH ~ 6). As misturas foram agitadas mecanicamente (200 rpm) por 5 min e, então, transferidas para uma placa de Petri (placas de vidro, diâmetro 85 mm e altura 10 mm). Em sequência, as placas foram colocadas em uma caixa selada (120 mm de largura e comprimento e 40 mm de altura) contendo ácido acético (50 mL) por 24 h a temperatura ambiente. Devido ao contato com o ácido acético gasoso, as misturas foram convertidas a hidrogéis formados pela complexação polieletrólítica entre QT e Pct. Esses hidrogéis foram recuperados e purificados em água deionizada (100 mL) por 24 h. É importante mencionar que os hidrogéis foram mantidos imersos em água, sob agitação, em um frasco selado. Os

hidrogéis purificados foram congelados e secos por liofilização (-55 °C, 48 h). Uma série de hidrogéis formados pela complexação polieletrólítica entre QT e Pct foram preparados variando a razão da massa entre QT e Pct, cuja composições são mostradas na **Tabela 13**. Todos esses materiais foram preparados a partir do protocolo experimental descrito acima e genericamente denominados de PEC-vap.

Tabela 13. Formulações dos hidrogéis QT:Pct preparados.

Razão QT/Pct (m/m)	Razão amino:carboxila	Massa QT (mg)	Massa Pct (mg)	AcOH no hidrogel (mL) ^a	Recuperação do AcOH (%) ^a
1:1	0,28	500	500	0,42 ± 0,02	99,21 ± 3,21
2:1	0,56	670	330	2,50 ± 0,09	97,41 ± 0,09
3:1	0,85	750	250	3,80 ± 0,10	98,93 ± 1,09
1:2	0,14	330	670	1,87 ± 0,06	99,00 ± 1,98
1:3	0,10	250	750	4,03 ± 0,12	98,51 ± 2,41

^aMédia de dez experimentos.

A quantidade de ácido acético teórica nos hidrogéis PEC-vap foi estimada por meio da titulação da água usada na purificação desses materiais. Para isso, a água utilizada no processo de purificação foi filtrada e acidificada pela adição de HCl (1 mol L⁻¹, 10 mL). Em seguida, NaOH (1 mol L⁻¹, 30 mL) foi adicionado. Assim, uma alíquota (25 mL) foi retrotitulada com HCl (0,04 mol L⁻¹) usando fenolftaleína como indicador. Concomitantemente, um branco analítico foi preparado utilizando água destilada (100 mL) que foi tratada seguindo o mesmo protocolo experimental descrito acima. A determinação da concentração de ácido acético presente na alíquota foi estimada a partir da subtração do volume utilizado na retrotitulação do branco com o da amostra. Obviamente, esse método possui limitações, entretanto, trata-se de uma maneira simples e eficiente de estimar a quantidade de ácido acético utilizada no preparo desses materiais (Piątek; Lisowski; Lisowska, 2017). Para contornar possíveis erros experimentais, cada amostra (isto é, a água usada na purificação dos complexos polieletrólíticos preparados pelo método de semidissolução/acidificação) de dez

diferentes experimentos foi titulada. O valor médio do ácido acético que difundiu na solução formadora de cada hidrogel PEC-vap preparado está descrito na **Tabela 13**, onde também consta a recuperação (%) do ácido acético. Esse valor foi estimado considerando a quantidade de ácido acético na caixa selada antes e após a formação dos hidrogéis.

Outro objetivo desse estudo é a comparação entre os materiais preparados pela complexação polieletrólítica da QT com a Pec utilizando o método de semidissolução/acidificação e o método convencional, baseado na simples mistura das soluções dos polissacarídeos. Portanto, a complexação polieletrólítica entre QT e Pct usando o método convencional também foi feita. A partir de uma extensa revisão da literatura, o método mais comum e usual para o preparo de complexos polieletrólíticos é a mistura das soluções de cada polissacarídeo (FAJARDO *et al.*, 2012b; QUADRADO; FAJARDO, 2020; ŞEN *et al.*, 2017; WU, L. X. *et al.*, 2019; ZHANG, J. Z. J. *et al.*, 2019). Dessa forma, esse protocolo experimental foi escolhido para preparar esse tipo de PEC. Esse procedimento foi genericamente nomeado de método “convencional”. Portanto, para preparar os PECs por esse método, uma solução de QT em água destilada (25 mL) contendo certa quantidade de ácido acético (descritas na **Tabela 13**) foi preparada. Separadamente, Pct foi solubilizada em água destilada (25 mL), sendo agitada a temperatura ambiente, obtendo-se uma solução homogênea. O pH da solução de Pct foi ajustado para pH 6 pela adição de uma solução aquosa de NaOH (1 mol L^{-1} , 1 mL). Em sequência, as soluções de QT e Pct foram misturadas e agitadas por agitação mecânica (200 ppm) por 5 min. As misturas resultantes foram transferidas para placas de Petri (placas de vidro, diâmetro 85 mm e altura 10 mm) e mantidas em repouso por 24 h em uma caixa selada. Após esse tempo, os materiais formados foram recuperados e purificados através de um processo em água (24 h), sendo, posteriormente, congelados e secos por liofilização ($-55 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 48 h). As quantidades de QT e Pct utilizadas para o preparo desses PECs pelo método convencional foram as mesmas descritas na **Tabela 13**. Esses materiais foram denominados de PEC-conv.

6.2.3. Técnicas de caracterização

Os materiais preparados foram caracterizados por FTIR, DSC e TG de acordo com os procedimentos relatados nos Capítulos anteriores. Análises de difração de raio-X (DRX) foram realizadas em um difratômetro Siemens D500 (Alemanha) equipado com uma fonte de radiação Cu-K α , utilizando uma tensão de 40 kV. As medidas foram efetuadas em um ângulo de varredura de 5 a 70°, com resolução de 0,02° e velocidade de varredura de 2 °/min. Os ensaios de extensão mecânica foram realizados no texturômetro TA.TX2 Stable Microsystems (Reino Unido) utilizando amostras retangulares do hidrogel (10 x 2 cm). O intumescimento máximo dos hidrogéis em diferentes condições de pH e nas soluções salinas foi estimado por meio do procedimento relatado no Capítulo 3 (Seção 3.2.4). Porém, nesse caso, as amostras dos hidrogéis foram imersas em soluções com diferentes pHs ou, então, em soluções com diferentes tipos e concentrações de sal (NaCl, CaCl₂ ou AlCl₃). De forma similar, os experimentos de perda de massa também foram realizados de acordo com o procedimento experimental relatado no Capítulo 3 (Seção 3.2.4.).

6.2.4. Encapsulação e liberação de curcumina (CUR)

Para investigar a potencial aplicação dos hidrogéis preparados como sistemas de liberação controlada, curcumina (CUR) foi encapsulada nesses materiais e sua liberação em meio PBS (pH 7,4) na temperatura de 37 °C foi investigada. Para encapsular a CUR nos hidrogéis, amostras secas desses materiais (50 mg) foram imersas em uma solução de CUR (0,125 mg mL⁻¹) preparada em uma mistura água/etanol (1:1) durante 24 h. Após esse período, as amostras foram recuperadas por filtração e secas na estufa (50 °C, 48 h). O sobrenadante da solução da CUR foi analisado em um espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 425 nm e, utilizando uma curva de calibração previamente construída, a quantidade de CUR encapsulada nos hidrogéis foi estimada. A eficiência do processo de encapsulação da CUR nos hidrogéis preparados foi estimada pela Eq. (23).

$$Encapsulação (\%) = \frac{[CUR]_0 - [CUR]_f}{[CUR]_0} \times 100 \quad (23)$$

onde $[CUR]_0$ é a quantidade inicial de CUR e $[CUR]_f$ é a quantidade de CUR remanescente no sobrenadante.

A CUR liberada dos hidrogéis foi investigada por ensaios *in vitro* em PBS (pH 7,4) na temperatura de 37 °C. Para isso, amostras dos hidrogéis contendo CUR (50 mg) foram imersas no meio de liberação e, em determinados intervalos de tempo, uma alíquota (3 mL) foi coletada e analisada no espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 425 nm. Por meio de uma curva de calibração previamente preparada, a quantidade de CUR liberada foi calculada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Não obstante, a cinética de liberação da CUR dos hidrogéis foi investigada a partir dos modelos cinéticos apresentados na **Tabela 14** (Lemos; de Souza; Fajardo, 2021).

Tabela 14. Modelos cinéticos utilizados para investigar a liberação de CUR dos hidrogéis preparados.

Modelo cinético	Equação
Ordem zero	$Q_t = Q_\infty + k_0 t$
Primeira ordem	$\ln(Q_t) = \ln(Q_\infty) + k_1 t$
Segunda ordem	$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 (Q_\infty)^2} + \frac{1}{Q_\infty} t$
Higuchi	$Q_t = k_H t^{0.5}$
Korsmeyer-Peppas	$\log\left(\frac{Q_t}{Q_\infty}\right) = \log k_{KP} + n \log t$

Em geral, esses modelos dependem da quantidade de CUR liberada em um intervalo de tempo (Q_t) e no equilíbrio (Q_∞). Além disso, neste estudo, o modelo cinético com o maior coeficiente de determinação (R^2) foi considerado como capaz de representar o mecanismo de liberação da CUR dos hidrogéis preparados.

6.3. Resultados e discussão

6.3.1. Preparo dos hidrogéis

As limitações associadas com a formação de PECs pelo método convencional estão relacionados com a rápida complexação dos polissacarídeos na interface de contato das soluções, que se tornam insolúveis durante a etapa de agitação e acarretam a formação de agregados heterogêneos de diferentes tamanhos (Murakawa *et al.*, 2019). Com o passar do tempo, esses agregados sedimentam resultando em um material compactado e muito frágil que, posteriormente, é recuperado. Outra característica desse protocolo para a obtenção de PECs é que, devido à rápida complexação, uma quantidade expressiva dos polissacarídeos é contida no interior dos coacervados, limitando a extensão e eficiência da complexação polieletrólítica (Wu *et al.*, 2018). Portanto, o PEC obtido pelo método convencional é um produto cinético cuja estrutura é constituída por um empacotamento desordenado dos polissacarídeos (Pergushov; Müller; Schacher, 2012). Como resultado, existe pouca coesão entre as cadeias dos polímeros, logo, materiais quebradiços são frequentemente obtidos. Esse efeito é mais preponderante quando polissacarídeos são utilizados no preparo do PEC (Hu *et al.*, 2019a).

Para contornar as desvantagens descritas acima, neste estudo, um hidrogel constituído por QT e Pct foi preparado por meio do método de semidissolução/acidificação, obtendo-se um material visualmente homogêneo e estável quando manipulado. A **Figura 45** mostra um esquema ilustrativo desse método. Como é possível verificar, nesse método, a QT é dispersa diretamente em uma solução de Pct resultando em uma mistura que, na língua inglesa, é denominada de mistura *slurry*. *A posteriori*, essa mistura é alocada em uma caixa selada, sendo submetida a uma atmosfera de ácido acético. Idealmente, o ácido acético gasoso lentamente difunde na mistura, infiltrando-se. Dessa forma, os grupos amina da QT são protonados ($-NH_2 \rightarrow -NH_3^+$) promovendo a dissolução e expansão gradual das cadeias desse polissacarídeo na solução de Pct. Eventualmente, os grupos protonados da QT e os grupos carboxílicos ionizados da Pct interagem fortemente por atração eletrostática formando uma rede tridimensional fisicamente reticulada. Ainda, cada zona contendo QT pode atuar como sítio de nucleação que, com o aumento do tempo de contato, cresce,

conectando-se aos outros sítios formando a rede polimérica fisicamente reticulada por interações eletrostática entre as cadeias da QT e Pct (Kulkarni *et al.*, 2016).

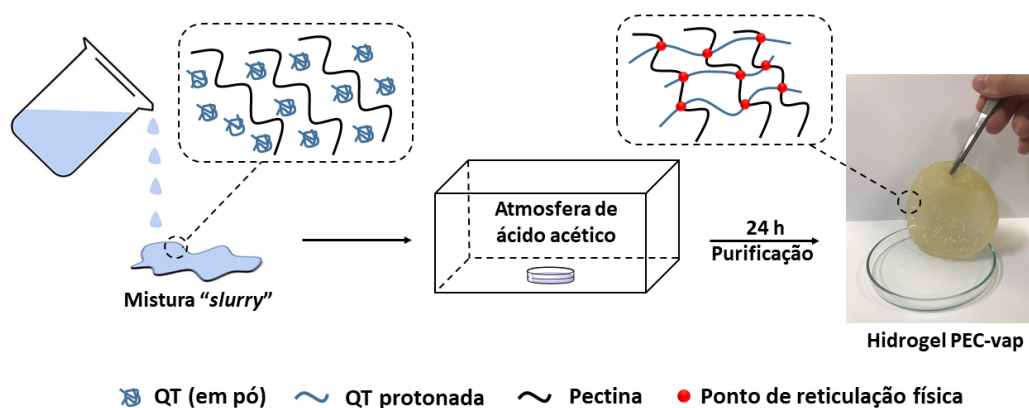


Figura 45. Esquema ilustrativo do preparo dos hidrogéis PEC-vap pelo método de semidissolução/acidificação.

Como observado, nesse método, a complexação polieletrólítica entre QT e Pct depende da penetração do ácido acético (no estado gasoso) na mistura *slurry*. Esse processo é lento por conta da interface líquido-vapor que limita a penetração do ácido acético na mistura e cria uma diferença de concentração na interface (Vachoud *et al.*, 2012). Essa diferença de concentração na interface gera um gradiente de concentração que atua como força motriz para a penetração de ácido acético na mistura e possibilita a complexação polieletrólítica (Vachoud *et al.*, 2012). Em geral, esse lento processo de complexação permite uma interação eficiente entre os polissacarídeos. Consequentemente, as cadeias dos polissacarídeos são empacotadas de forma organizada e regiões altamente ordenadas são formadas (Vachoud *et al.*, 2012). Dessa forma, é possível especular que, a partir do método de semidissolução/acidificação, um hidrogel com uma estrutura organizada, uniforme e estável pode ser obtido. Neste estudo, hidrogéis formados pela complexação polieletrólítica convencional entre QT e Pct também foram preparados. Esses materiais foram preparados pela simples mistura das soluções de QT e Pct nas mesmas condições de temperatura e agitação que os

hidrogéis obtidos pelo método de semidissolução/acidificação. O método de preparo dos hidrogéis preparados pela complexação polieletrólítica convencional foi selecionado após uma extensa revisão da literatura (Kulkarni *et al.*, 2016).

A **Figura 46** mostra as imagens fotográficas dos hidrogéis preparados por cada método (semidissolução/acidificação e método convencional) com diferentes quantidades de QT e Pct. Como é possível observar, o método de semidissolução/acidificação resultou em típicos hidrogéis, independente da composição, que podem ser facilmente manipulados sem nenhum tipo de dano à sua integridade estrutural. Esses hidrogéis apresentaram um diâmetro aproximado de 8 mm e uma espessura de 10 mm. Em contraste, os hidrogéis preparados pelo método convencional são extremamente frágeis e, em alguns casos, apenas aglomerados formados pela complexação polieletrólítica entre a QT e Pct foram formados (ver **Figura 46**). Essas observações claramente realçam as diferenças entre os dois métodos de preparo de PEC. Aparentemente, o método de semidissolução/acidificação permite a obtenção de materiais mais robustos e estáveis, provavelmente, devido a complexação polieletrólítica mais homogênea entre a QT e a Pct. Essa observação é condizente com a hipótese de que o método de semidissolução/acidificação possibilita uma interação eletrostática mais eficiente entre os grupos funcionais carregados da QT e Pct e, por consequência, a complexação polieletrólítica entre os polissacarídeos é mais efetiva. Desse modo, uma rede polimérica fortemente reticulada por interações físicas (nesse caso, atração eletrostática) é formada. Objetivamente, os resultados obtidos suportam essa conclusão. Apesar desses resultados, é vital mencionar que o processo de complexação polieletrólítica é afetado por vários parâmetros (por exemplo, pH, força iônica, temperatura e grau de ionização dos polissacarídeos). Neste estudo, esses fatores não foram investigados e seu efeito serão objeto de investigação em trabalhos futuros.

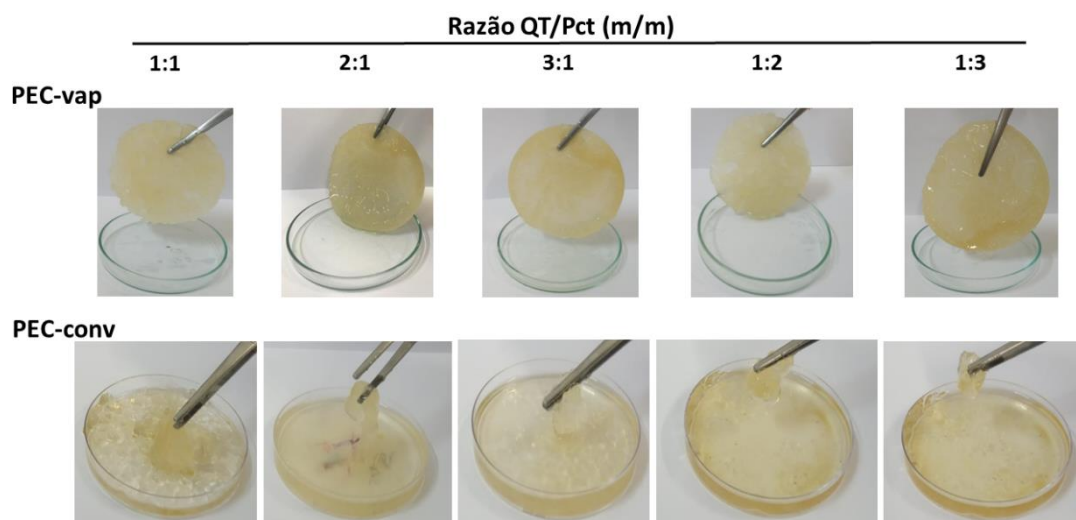


Figura 46. Imagens fotográficas dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv preparados.

Portanto, visando uma comparação mais precisa, os hidrogéis PEC-vap e PEC-conv preparados foram caracterizados por FTIR, DSC e TG. As propriedades mecânicas, intumescimento e perda de massa dos hidrogéis preparados também foram avaliadas.

6.3.2. Caracterização dos hidrogéis

A formação dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv é baseada na interação eletrostática entre os grupos amina protonados da QT e os grupos carboxílicos ionizados da Pct. Entretanto, ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas são fundamentais para proporcionar uma maior estabilidade ao par iônico formado entre os grupos carregados (GIERSZEWSKA; OSTROWSKA-CZUBENKO; CHRZANOWSKA, 2018). Em uma menor intensidade, interações hidrofóbicas também contribuem na estabilização do PEC (Otoni *et al.*, 2020). Todas essas interações existem na matriz dos hidrogéis e a técnica de FTIR é uma boa ferramenta para sua investigação. Portanto, a natureza química dos hidrogéis (PEC-vap e PEC-conv) preparados foi investigada por meio da técnica de FTIR e os espectros obtidos são apresentados na **Figura 47**.

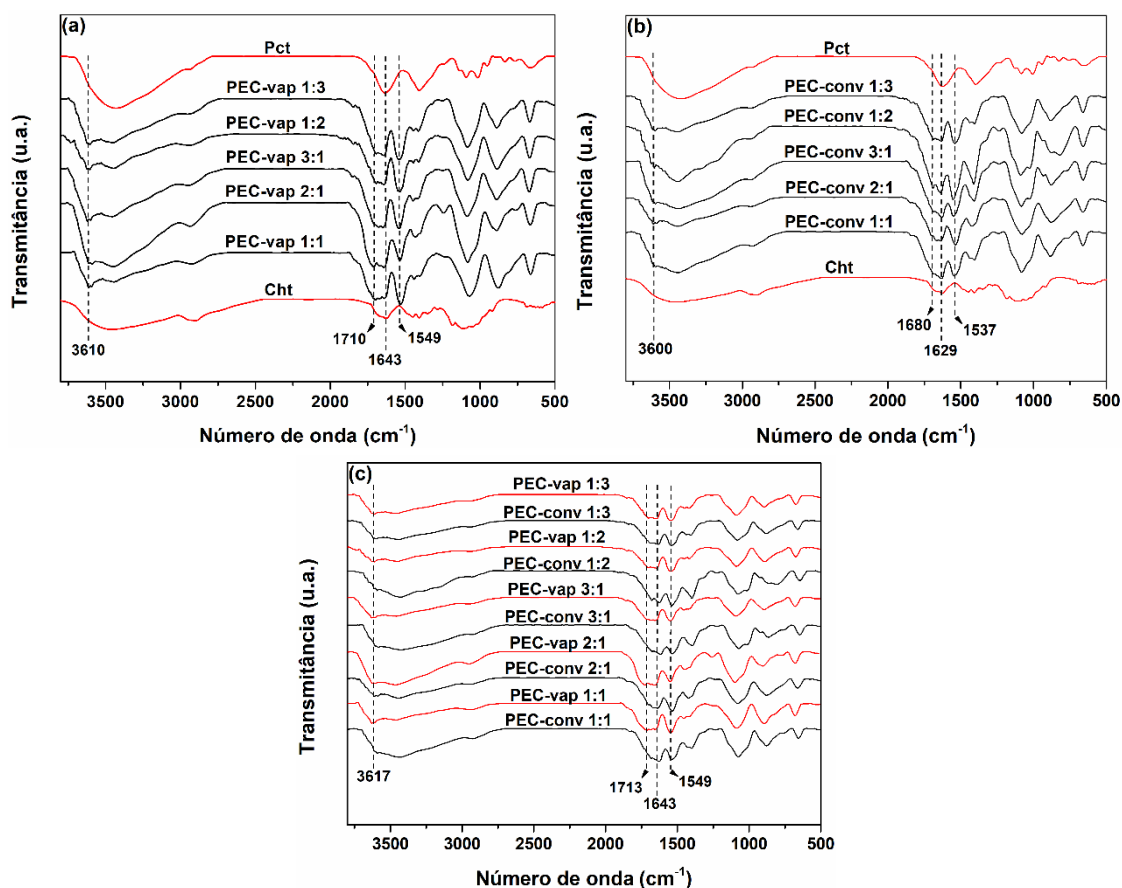


Figura 47. Espectros de FTIR dos hidrogéis PEV-vap (a) e PEC-conv (b), e a comparação direta deles (c).

Na **Figura 47a** são mostrados os espectros de FTIR dos hidrogéis preparados pelo método de semidissolução/acidificação. Esses espectros apresentaram algumas bandas características da QT e Pct em 1440 cm^{-1} (estiramento da ligação C–N) e em 1080 cm^{-1} (estiramento da ligação C–O da unidade sacarídica) (de Souza; da Silva; Fajardo, 2017a). Além destas bandas, é possível observar duas novas bandas em 1710 cm^{-1} e 1643 cm^{-1} que correspondem, respectivamente, ao estiramento assimétrico da ligação C=O dos grupos carboxílicos em sua forma ionizada (–COO^-) e protonada (–COOH) (KATUWAVILA et al., 2016; TAHA et al., 2008). De maneira geral, a presença dessas bandas no espectro de FTIR de complexos polieletrólíticos envolvendo a QT e Pct é amplamente descrita na literatura (Ranganathan et al., 2019). Também é possível verificar a presença de uma banda, ausente nos espectros dos polissacarídeos puros, em 1550 cm^{-1} , a qual pode ser atribuída aos grupos

amina protonados ($-\text{NH}_3^+$) da QT que interagem eletrostaticamente com os grupos carboxílicos ionizados da Pct (Gierszewska; Ostrowska-Czubenko; Chrzanowska, 2018a). De maneira geral, a presença dessas bandas confirma que a formação dos hidrogéis é baseada na interação eletrostática entre os grupos amina e carboxila ionizados dos polissacarídeos.

Todos os espectros dos hidrogéis PEC-vap apresentaram um conjunto de bandas interessante na região de $3750\text{--}3060\text{ cm}^{-1}$, onde tipicamente é observada a sobreposição das bandas referentes aos estiramentos vibracionais das ligações O–H e N–H dos grupos hidroxila e amina (GIERSZEWSKA; OSTROWSKA-CZUBENKO; CHRZANOWSKA, 2018). Como observado na **Figura 47a**, os espectros dos hidrogéis PEC-vap apresentaram uma banda afinada em torno de 3600 cm^{-1} e uma banda larga centrada em 3450 cm^{-1} . Em comparação com outros trabalhos na literatura, a presença dessas bandas não é uma observação comum levando em consideração outros materiais baseados em PEC (Dubey *et al.*, 2020; Ranganathan *et al.*, 2019). Tal observação pode estar relacionada com a eficiência do processo de complexação polieletrólítica, especificamente, o pareamento entre os grupos amina e carboxila ionizados e a formação do par iônico (Lall *et al.*, 2020). Como mencionado anteriormente, ligações de hidrogênio atuam como forças auxiliares no processo de complexação polieletrólítica, já que tais interações físicas aproximam as cadeias poliméricas e facilitam a interação eletrostática entre os grupos funcionais carregados dos polissacarídeos (Gierszewska; Ostrowska-Czubenko; Chrzanowska, 2018b). Isto posto, a banda afinada em 3600 cm^{-1} nos espectros de FTIR dos hidrogéis PEC-vap está, provavelmente, relacionada ao estiramento O–H dos grupos hidroxila que não participam de ligações de hidrogênio no interior da matriz dos hidrogéis (Enev *et al.*, 2019). Em contrapartida, a banda larga centrada em 3450 cm^{-1} é relacionada com os grupos amina e hidroxila envolvidos em ligações de hidrogênio (Branca *et al.*, 2016; Enev *et al.*, 2019). Nesse contexto, a presença dessas bandas no espectro dos hidrogéis PEC-vap indicam que essas interações entre os grupos funcionais nos materiais são fortes ao ponto de mudar completamente o ambiente químico dos grupos hidroxila livres (ou seja, não envolvidos nas ligações de hidrogênio), resultando na quebra da sobreposição das bandas (Branca *et al.*, 2016).

Comparando os espectros dos hidrogéis PEC-vap formados, é possível verificar que as bandas dos grupos amina e carboxílicos ionizados aparecem em diferentes números de onda dependendo da composição do hidrogel. Por exemplo, a banda associada aos grupos -NH_3^+ interagindo eletrostaticamente com os grupos -COO^- aparece em números de onda maiores na mesma proporção em que a razão de massa QT/Pct aumenta, como sumarizado na **Tabela 15**. Considerando a razão de massa QT/Pct, o aumento no número de onda dessa banda ocorre na seguinte ordem: $3:1 > 2:1 > 1:2 > 1:3 > 1:1$. Essa tendência revela que as interações eletrostáticas entre os grupos carregados dos polissacarídeos são mais fortes nos hidrogéis PEC-vap preparados com uma maior quantidade de QT, uma vez que a forte interação eletrostática diminui o comprimento da ligação N–H dos grupos -NH_3^+ e resulta no deslocamento dessa banda para maiores números de onda (Derkach *et al.*, 2020). Como observado na **Tabela 15**, as bandas associadas aos grupos funcionais ionizados da QT e Pct são observados em maiores números de onda para os hidrogéis PEC-vap do que os hidrogéis PEC-conv, independente da composição. Obviamente, a composição dos hidrogéis também influencia o espectro de FTIR desses materiais, já que a razão mássica entre os polissacarídeos reflete a razão entre os grupos funcionais carregados, que por sua vez afeta o processo de complexação polieletrólítica e a formação dos hidrogéis (Gierszewska; Ostrowska-Czubenko; Chrzanowska, 2018b). De maneira geral, a razão entre os grupos amina:carboxil é próxima a 1 ao passo que a quantidade de QT na formulação dos hidrogéis aumenta (**Tabela 13**). Portanto, nas formulações contendo uma maior quantidade de QT, a quantidade dos grupos carregados é similar, um fato que, teoricamente, beneficia a complexação polieletrólítica (Otoni *et al.*, 2020). Apesar disso, a equivalência entre os grupos amina e carboxila carregados não explica todos os deslocamentos de banda observados. Especificamente, a banda associada aos grupos -NH_3^+ dos hidrogéis PEC-vap preparados com mais Pct ocorre em um maior número de onda do que a mesma banda do hidrogel preparado com a razão QT/Pct de 1:1, onde a quantidade dos grupos amina e carboxila são mais equivalentes (**Tabelas 13**). Essa constatação é relativamente difícil de explicar, mas é possível especular que o aumento na quantidade de Pct favorece a formação de ligações de hidrogênio nessas formulações por conta da facilidade dos grupos carboxila em estabelecer tais

ligações, haja visto que esse tipo de grupo funcional possui uma fração aceptora e doadora de hidrogênio (Francis; Watkins; Kubelka, 2017). Consequentemente, a complexação polieletrólítica é beneficiada em comparação com a formulação contendo a mesma quantidade de QT e Pct.

Tabela 15. Principais bandas observadas nos espectros de FTIR dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv.

Hidrogel	Razão QT/Pct (m:m)	Bandas observadas ^a			
		Estiramento O–H dos grupos –OH livres	Estiramento N–H dos grupos –NH ₃ ⁺	Estiramento C=O assimétrico dos grupos –COO [–]	Estiramento C=O assimétrico dos grupos –COOH
PEC-vap	1:1	3601	1538	1680	1643
	2:1	3610	1549	1684	1646
	3:1	3617	1551	1688	1648
	1:2	3608	1540	1683	1647
	1:3	3605	1541	1682	1644
PEC-conv	1:1	3596	1535	1677	1627
	2:1	3601	1537	1679	1629
	3:1	3603	1539	1680	1633
	1:2	3600	1536	1678	1628
	1:3	3598	1530	1678	1627

^a Unidade: número de onda em cm⁻¹.

Os espectros de FTIR dos hidrogéis PEC-conv são apresentados na **Figura 47b**. O espectro desses hidrogéis também apresentou uma banda afinada e outra banda larga na região 3750–3060 cm⁻¹, previamente observadas para os hidrogéis PEC-vap. A presença dessas bandas no espectro de FTIR dos hidrogéis preparados pelo método convencional sugere que o processo de complexação polieletrólítica desses materiais também induziu a separação da banda associada ao estiramento O–H dos grupos hidroxila livres. Não obstante, nos espectros dos hidrogéis PEC-conv preparados também apresentaram as bandas associadas ao estiramento C=O dos grupos –COO[–] e –COOH da Pct; a banda referente aos grupos –NH₃⁺ da QT interagindo eletrostaticamente com os

grupos -COO^- e a banda do estiramento simétrico dos grupos carboxílicos. Em comparação com os hidrogéis PEC-vap, essas bandas foram observadas em números de onda menores (**Tabela 15**). Novamente, comparando os hidrogéis preparados com uma razão de QT e Pct diferente, essas bandas são observadas em diferentes números de onda (**Tabela 15**) e com uma ligeira diferença de intensidade. Resumidamente, essas bandas são observadas em maiores número de onda à medida que a quantidade de QT na composição dos hidrogéis aumenta. Como observado para os hidrogéis PEC-vap, as bandas mencionadas acima também são observadas em maiores número de onda para os hidrogéis PEC-conv com mais Pct em comparação com o hidrogel PEC-conv preparado com a mesma razão de QT e Pct (hidrogel PEC-conv 1:1). Logo, o efeito da composição dos hidrogéis nos respectivos espectros de FTIR é o mesmo.

Finalmente, a comparação entre os espectros de FTIR dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv é mostrada na **Figura 47c**. As principais diferenças estão associadas às bandas atribuídas aos grupos -COO^- (e -COOH) e -NH_3^+ . De maneira geral, essas bandas são observadas em maiores números de onda para os hidrogéis PEC-vap em comparação com os hidrogéis PEC-conv (**Tabela 15**). Ainda, a intensidade da banda atribuída ao estiramento simétrico dos grupos -COO^- é ligeiramente menor nos hidrogéis PEC-vap, independente da composição. Essas observações indicam que a complexação polieletrólítica entre QT e a Pct é mais eficiente nos hidrogéis PEC-vap do que nos hidrogéis PEC-conv, sendo uma consequência direta dos distintos mecanismos envolvidos em cada método de preparo desses hidrogéis (Pragya *et al.*, 2021). Todos os resultados obtidos a partir das análises de FTIR indicam que o método de semidissolução/acidificação resulta em um processo de complexação polieletrólítica mais eficiente ao favorecer as interações eletrostáticas entre os grupos funcionais carregados da QT e Pct. Como resultado da complexação polieletrólítica eficiente, as cadeias poliméricas dos polissacarídeos na matriz dos hidrogéis PEC-vap atingem uma organização termodinamicamente estável (Kaushik *et al.*, 2018; Vachoud *et al.*, 2012).

As propriedades térmicas dos hidrogéis preparados foram investigadas por análises de DSC e TG. Em especial, a técnica DSC é amplamente utilizada para identificar transições de fase e conformação em uma amostra durante o

aumento de temperatura (Grinberg *et al.*, 2014). Dessa forma, a análise de DSC pode fornecer algumas importantes informações sobre a organização interna dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv. Na **Figura 48** são mostradas as curvas DSC da QT e Pct (**Figura 48a**) e das amostras dos hidrogéis PEC-vap (**Figura 48b**) e PEC-conv (**Figura 48c**). Na faixa de temperatura entre 30 e 130 °C, todas as amostras exibiram um largo pico endotérmico atribuído à evaporação de componentes voláteis, principalmente, água (Fajardo *et al.*, 2010a). A curva de DSC da QT apresentou um pico exotérmico largo em 265 °C, enquanto a curva da Pct exibiu um pico exotérmico intenso em 245 °C. Estes dois picos, em ambas as curvas DSC dos polissacarídeos, são relacionados a sua degradação térmica (Fajardo *et al.*, 2010a; Wu *et al.*, 2019).

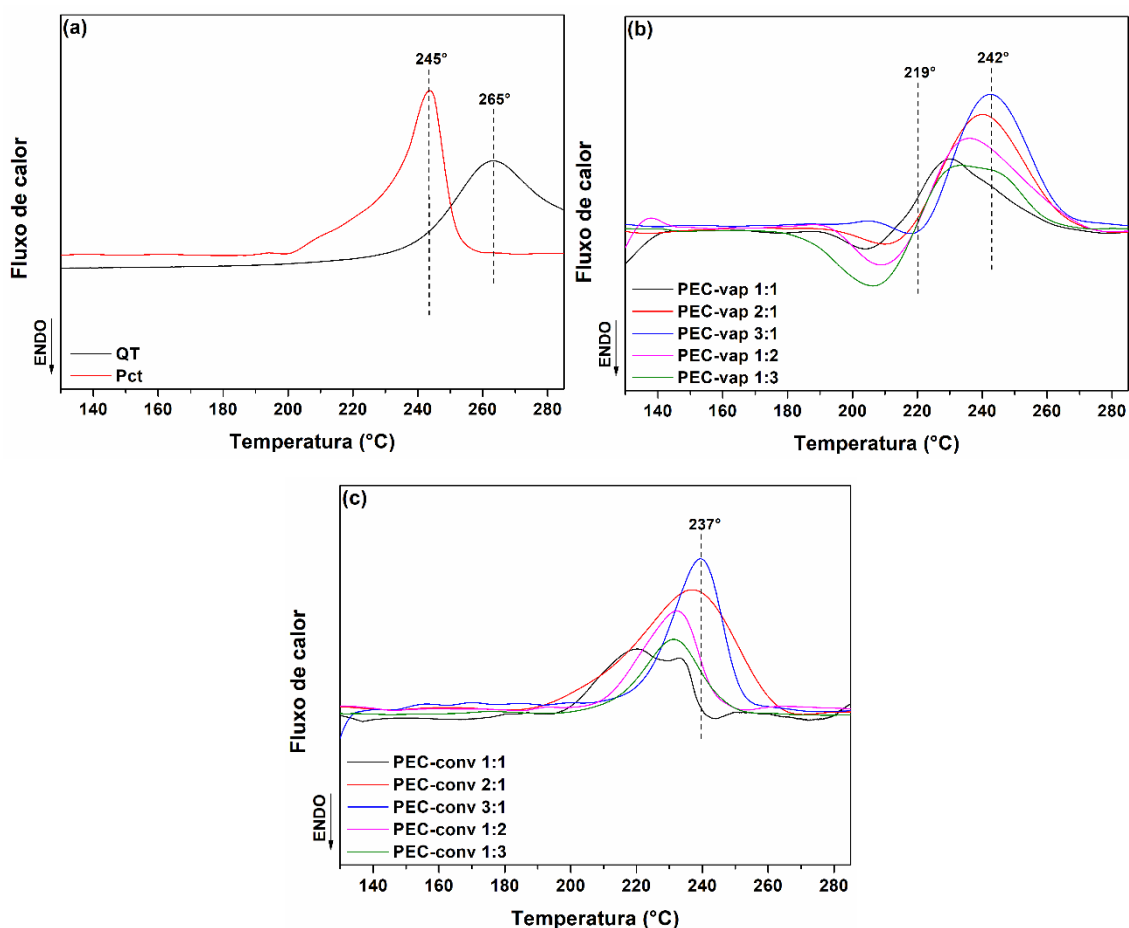


Figura 48. Curvas de DSC da QT e Pct (a) e dos hidrogéis PEC-vap (b) e PEC-conv (c).

Comparando as curvas DSC da QT e Pct com a dos hidrogéis PEC-vap (**Figura 48b**) e PEC-conv (**Figura 48c**), novos picos (endotérmicos e exotérmicos) podem ser observados nas curvas DSC obtidas para esses materiais. Todavia, todos os picos nas curvas dos hidrogéis são observados em temperaturas menores do que os picos atribuídos à degradação térmica da QT e Pct. Durante o processo de complexação polieletrólítica, a formação dos pares iônicos ($-\text{COO}^-$ e $-\text{NH}_3^+$) entre a QT e Pct promove a ruptura das ligações de hidrogênio intra e inter-cadeias. Como consequência, as estruturas cristalinas dos polissacarídeos, formadas pelas cadeias poliméricas unidas por ligações de hidrogênio, são enfraquecidas ou completamente destruídas (Fajardo *et al.*, 2010a). Portanto, a formação da rede polimérica formada pela complexação polieletrólítica entre QT e Pct deve apresentar uma estabilidade e perfil térmico distinto dos polissacarídeos puros. Nesse sentido, a estrutura dos hidrogéis preparados pelo método de semidissolução/acidificação também irá apresentar um perfil térmico diferente dos hidrogéis obtidos pelo método convencional e essas particularidades podem ser inferidas a partir dos resultados da análise DSC (Piai; Rubira; Muniz, 2009).

De fato, comparando as curvas DSC dos hidrogéis é possível verificar claras diferenças. A principal diferença é a presença de um pico endotérmico nas curvas DSC dos hidrogéis PEC-vap entre 190 e 210 °C que não pode ser observado nas curvas DSC dos hidrogéis PEC-conv. Curiosamente, alguns trabalhos na literatura também relataram a presença desse pico endotérmico nas curvas DSC de diferentes tipos de PEC (FAJARDO *et al.*, 2010a). De modo geral, o pico endotérmico presente nas curvas DSC dos hidrogéis PEC-vap está associado com regiões altamente ordenadas na matriz desses materiais (Fajardo *et al.*, 2010b). Tais regiões são formadas por cadeias de QT e Pct que interagem fortemente através da atração eletrostática entre os seus grupos funcionais carregados e promovem a formação de pares iônicos estáveis, que agem como ponto de união entre as cadeias poliméricas (Fajardo *et al.*, 2010b). Essas regiões atuam como ponto de reticulação adicional e contribuem para a estabilização da rede polimérica dos hidrogéis PEC-vap (Jamróz *et al.*, 2021). Além disso, a presença desse pico está diretamente relacionada à estabilidade das interações eletrostáticas na rede polimérica dos hidrogéis (Fajardo *et al.*,

2012b). Com o intuito de obter mais informações sobre o comportamento térmico dos hidrogéis, as temperaturas dos picos (endotérmico e exotérmico) observados nas curvas de DSC dos hidrogéis e seus respectivos valores de entalpia foram sumarizados na **Tabela 16**.

Tabela 16. Temperatura e entalpia (ΔH) dos picos endotérmicos e exotérmicos observados nas curvas de DSC dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv.

Hidrogel	Razão QT:Pct (m:m)	Pico endotérmico		Pico exotérmico	
		T (°C)	ΔH (J g ⁻¹)	T (°C)	ΔH (J g ⁻¹)
PEC-vap	1:1	203	10,60	228	31,50
	2:1	213	19,30	237	31,06
	3:1	219	25,00	249	33,01
	1:2	210	17,00	236	27,51
	1:3	207	14,32	233	26,00
PEC-conv	1:1	–	–	220	23,00
	2:1	–	–	235	31,00
	3:1	–	–	237	32,00
	1:2	–	–	232	26,00
	1:3	–	–	229	24,61

De acordo com os dados expostos na **Tabela 16**, a temperatura e os valores da entalpia do pico endotérmico, somente observado para os hidrogéis PEC-vap, são maiores à medida que a quantidade de QT na composição dos materiais aumenta, logo, indicando que uma maior quantidade de energia é necessária para promover o evento endotérmico nas amostras preparadas nessas condições. Por outro lado, o aumento na quantidade de Pct diminui a temperatura onde o pico endotérmico é observado, como também, a sua entalpia. Essa tendência está associada com a interação eletrostática entre os grupos carregados da QT e Pct. Como mencionado anteriormente, nos hidrogéis preparados com uma maior quantidade de QT, a razão entre os grupos amino e carboxila é mais equivalente (**Tabela 11**). Consequentemente, nessas condições, a complexação polieletrólítica entre os grupos carregados é beneficiada e uma rede polimérica estável é obtida, como indicado pelas análises

de FTIR. A ausência do pico endotérmico nos hidrogéis PEC-conv e os valores de entalpia obtidos fortalecem a hipótese da formação de regiões ordenadas na matriz dos hidrogéis PEC-vap. Adicionalmente, os valores da entalpia do pico endotérmico refletem a ordenação e estabilidade de tais regiões, uma vez que uma maior quantidade de energia é necessária para promover um evento térmico nos domínios ordenados de uma amostra durante a análise de DSC (Cardoso *et al.*, 2021). Os dados da **Tabela 16** revelam que a temperatura do pico endotérmico (e a respectiva entalpia) é maior nos hidrogéis PEC-vap preparados com mais Pct do que nos hidrogéis preparados com a mesma quantidade de polissacarídeos. Novamente, esse comportamento é decorrente da quantidade de ligações de hidrogênio entre os polissacarídeos nesses materiais que favorecem a formação dos pares iônicos e a complexação polieletrólítica em comparação com os hidrogéis constituídos com a mesma quantidade de QT e Pct. O destaque desse comportamento é importante, pois, o aumento na quantidade de Pct diminui a estabilidade térmica dos hidrogéis em comparação com os mesmos materiais preparados com excesso de QT.

Ainda considerando a comparação das curvas DSC dos hidrogéis PEC-vap com a dos PEC-conv, outra diferença entre esses materiais é a temperatura do pico exotérmico atribuído à decomposição térmica da rede polimérica dos hidrogéis (218–260 °C). Como é possível verificar na **Figuras 48b e 48c** e na **Tabela 16**, esse pico é observado em temperaturas maiores nas curvas DSC dos hidrogéis PEC-vap. Tendo em vista esses resultados, é possível inferir que os hidrogéis PEC-vap possuem uma maior estabilidade térmica quando comparados com os hidrogéis PEC-conv. Curiosamente, o pico exotérmico observado na curva DSC do hidrogel PEC-conv 1:1 possui um pequeno ombro em torno de 232 °C que pode indicar que os polissacarídeos (QT e Pct) não degradam em uma única etapa, como ocorre com os outros materiais. Esse comportamento é comumente observado quando o processo de complexação polieletrólítica não é eficiente e os polissacarídeos não formam uma estrutura coesa (Fathi *et al.*, 2011). Todos os resultados das curvas DSC dos hidrogéis preparados reforçam a hipótese de que o método de semidissolução/acidificação resulta em materiais com uma estrutura interna organizada, estável e homogênea. Essas conclusões são fortalecidas pelos resultados das análises de

TG dos hidrogéis preparados. As curvas TG dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv são apresentadas na **Figura 49**.

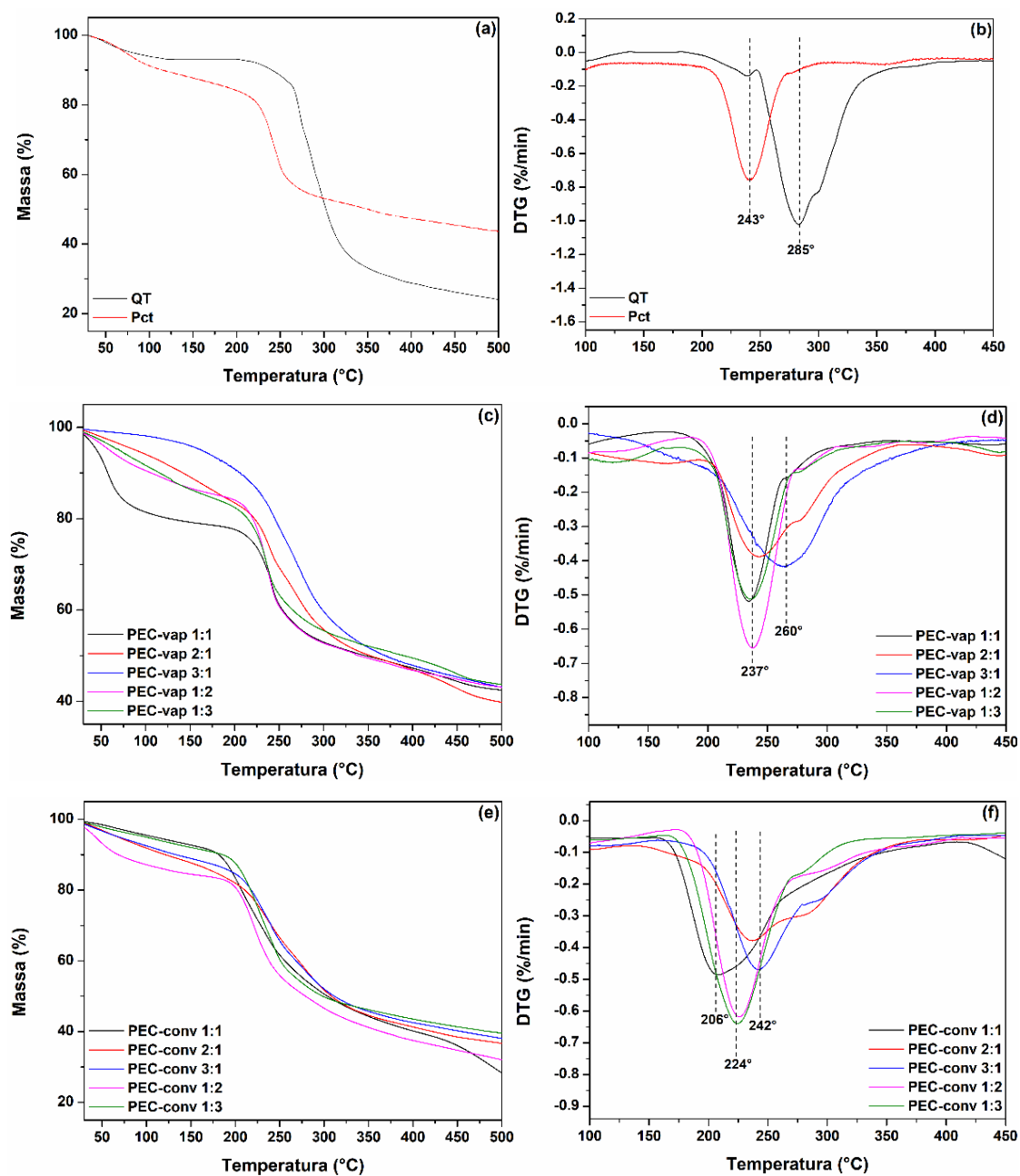


Figura 49. Curvas de TG e DTG da QT e Pct (a,b) e dos hidrogéis PEC-Vap (c,d) e PEC-conv (e,f).

Todas as amostras (incluindo QT e Pct) apresentaram uma perda inicial de massa entre 30 °C e 160 °C por conta da volatilização da água absorvida nas

amostras (Fajardo *et al.*, 2012b). Todas as curvas TG dos hidrogéis preparados possuem uma única etapa larga de degradação, porém, em diferentes temperaturas. Essas discrepâncias são evidenciadas nas curvas DTG obtidas das curvas TG de cada amostra (**Figuras 49b, 49d, e 49f**). Para os hidrogéis PEC-vap, os máximos de perda de massa ocorrem em maiores temperaturas do que para os hidrogéis PEC-conv. Essas observações reforçam as conclusões obtidas nas análises de DSC. Em geral, a maior estabilidade dos hidrogéis PEC-vap está relacionada ao processo de preparo desses materiais que permite uma interação mais eficiente entre os grupos funcionais carregados da QT e Pct. Portanto, esse material apresenta uma grande estabilidade térmica. Ainda, como nas análises de DSC, o comportamento térmico das amostras também varia de acordo com a sua composição, especificamente, com a razão mássica entre QT e Pct. Em síntese, quanto maior a quantidade de QT, maior a estabilidade térmica do hidrogéis por causa do balanço entre os grupos carregados e uma melhor complexação. Mais uma vez como observado nas análises de DSC, os hidrogéis formulados com um excesso de Pct são mais estáveis termicamente que os hidrogéis preparados com a mesma razão mássica entre os polissacarídeos (razão QT:Pct igual a 1:1). Entretanto, considerando todas as composições investigadas, o aumento da quantidade de Pct prejudica a estabilidade térmica dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv.

Portanto, os resultados das análises térmicas (DSC e TG) estão bem correlacionados com as conclusões inferidas pela análise dos espectros de FTIR dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv. Ainda, considerando a composição dos hidrogéis, a complexação polieletrólítica é mais eficiente na seguinte ordem de composição mássica entre QT e Pct: 3:1 > 2:1 > 1:2 > 1:3 > 1:1. Dessa forma, todos os resultados obtidos indicam que o método de semidissolução/acidificação resulta em um hidrogel formado por uma rede polimérica eficientemente reticulada. Tal característica promove uma grande estabilidade para esse material. Essencialmente, a constituição de redes poliméricas baseadas na complexação polieletrólítica entre polieletrólitos (QT e Pct) depende da atração eletrostática entre os respectivos grupos carregados e da formação de pares iônicos intrínsecos (originados da interação entre as cargas dos polieletrólitos) (Manoj Lalwani; Eneh; Lutkenhaus, 2020). A formação

desses pares domina o processo de complexação entre os polieletrólitos e define a estrutura e organização da rede polimérica (Manoj Lalwani; Eneh; Lutkenhaus, 2020). Essa característica é responsável pelas distintas estruturas verificadas nos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv, como ilustrado na **Figura 50**.

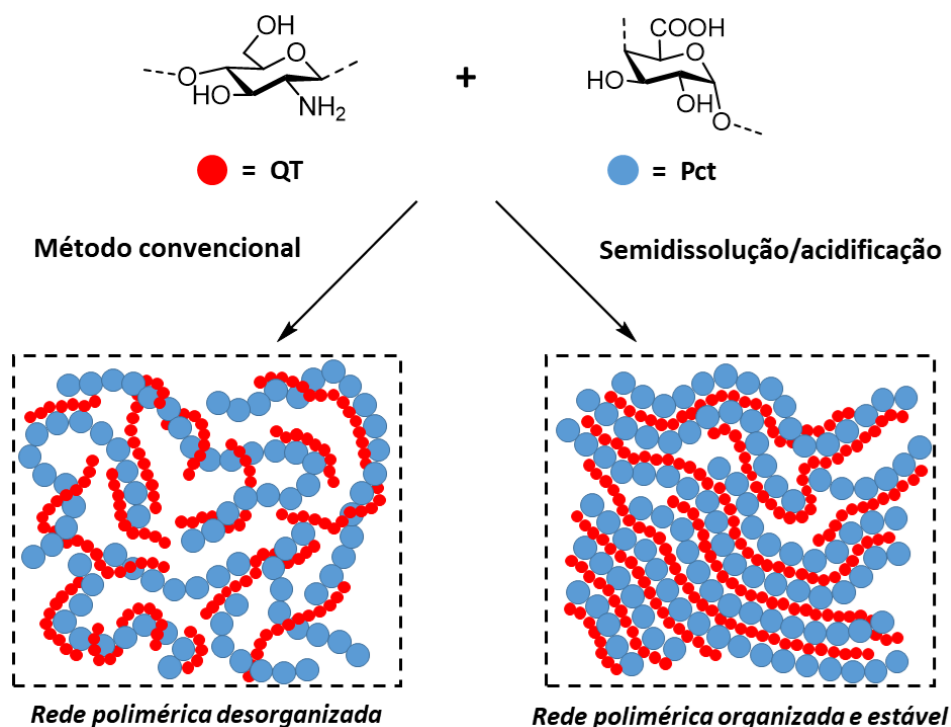


Figura 50. Estruturas dos hidrogéis obtidos pelo método convencional e pelo método de semidissolução/acidificação.

No método convencional, a interação eletrostática entre os polissacarídeos carregados é ineficiente por conta da formação de coacervados e de agregados heterogêneos na interface da mistura das soluções. Essas estruturas restringem a mobilidade das cadeias e impedem a sua reorganização para conformações mais estáveis, onde a interação eletrostática entre os grupos carregados e a estabilidade da rede polimérica formada são máximas (Kaushik *et al.*, 2018). Como discutido anteriormente, a rede polimérica formada pela complexação polieletrólítica utilizando o método convencional é um produto cinético com uma estrutura desorganizada (**Figura 50**). Em contraste, a complexação polieletrólítica no método de semidissolução/acidificação é lento e as cadeias poliméricas possuem maior liberdade de movimento no início da

complexação (Manoj Lalwani; Eneh; Lutkenhaus, 2020). Assim, as cadeias são capazes de atingir o estado de maior estabilidade termodinâmica e organização possível. Esse é um ponto importante da dinâmica da complexação polieletrólítica observada no método de semidissolução/acidificação por conta das forças entrópicas e entálpicas responsáveis por esse processo (Otoni *et al.*, 2020). Na formação de PECs de polieletrólitos fracos, como polissacarídeos, a complexação não é exclusivamente proporcionada pelo ganho entrópico da liberação dos contra-íons dos polímeros (Rathee *et al.*, 2018). Nesse caso, as contribuições entálpicas são relevantes para induzir a complexação polieletrólítica e a energia livre do PEC formado é significativamente reduzida na presença de um ambiente com uma alta densidade de carga localizada (pares iônicos) (Rathee *et al.*, 2018). Nesse cenário, a complexação polieletrólítica mais eficiente observada no método de semidissolução/acidificação resulta em uma rede polimérica formada por QT e Pct termodinamicamente estável (Otoni *et al.*, 2020). Portanto, a rede formada é caracterizada pela presença de um elevado grau de ordenação. De maneira geral, as análises térmicas sugerem a presença de regiões altamente ordenadas na rede polimérica dos hidrogéis preparados através do método de semidissolução/acidificação. Para confirmar essa hipótese, a estrutura interna dos hidrogéis PEC-conv e PEC-vap foi investigada por meio da técnica de difração de raio-X (DRX), cujo resultados são mostrados na **Figura 51**.

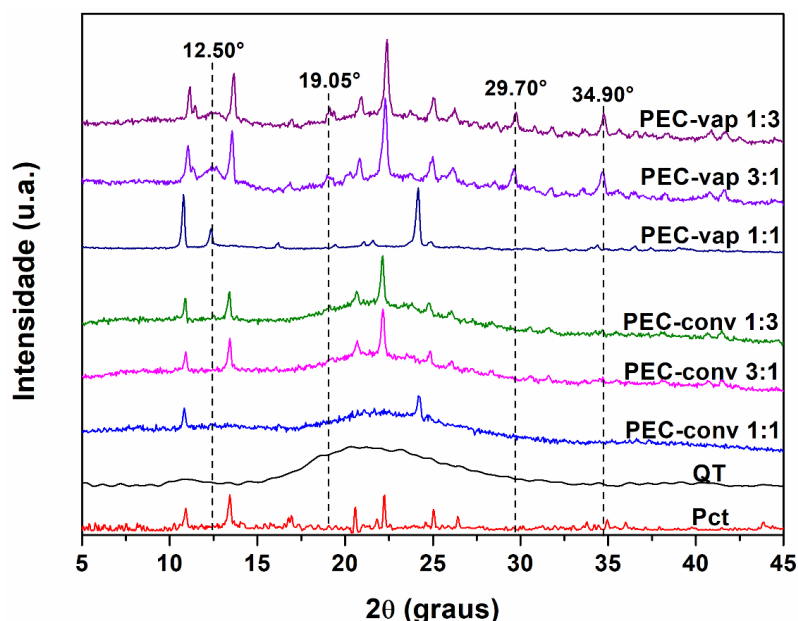


Figura 51. Padrões de DRX da QT, Pct e dos hidrogéis PEC-conv e PEC-vap preparados com diferentes razões de massa entre QT e Pct.

A **Figura 51** mostra os padrões de raio-X dos polissacarídeos puros (QT e Pct) e dos hidrogéis preparados. Com exceção dos hidrogéis preparados com a razão de massa QT:Pct de 1:1, todos os outros materiais apresentaram um perfil difratométrico semelhante. Dessa forma, somente os padrões de DRX dos hidrogéis preparados com a razão mássica QT:Pct de 1:1, 3:1 e 1:3 foram apresentados para comparação. A Pct possui diversos picos de difração em $2\theta \sim 10^\circ$, 13° , 20° , 22° , 25° e 26° . A presença desses picos indica que a Pct utilizada no preparo dos hidrogéis possui uma natureza semicristalina, provavelmente, por conta de ligações de hidrogênio intra e inter-cadeias (Lessa; Nunes; Fajardo, 2018). Para QT, apenas um pico difratométrico largo em $2\theta \sim 20^\circ$ foi observado, sendo condizente com os resultados obtidos por alguns trabalhos anteriores (Hamdaoui *et al.*, 2021; Lemos; de Souza; Fajardo, 2021). Independentemente da composição dos hidrogéis, os respectivos padrões de DRX apresentaram picos de difração provenientes dos polissacarídeos, especialmente da Pct, já que esse polissacarídeo possui uma maior cristalinidade do que a QT (Hastuti *et al.*, 2018). Todavia, como mencionado acima, os hidrogéis preparados com uma razão mássica QT:Pct de 1:1 apresentaram padrões de DRX distintos dos outros materiais. Como observado na **Figura 52**, poucos picos de difração associados

à Pct são observados nesses hidrogéis. Tipicamente, o padrão de DRX de um PEC depende da proporção mássica entre os polissacarídeos utilizados em seu preparo (Lessa; Nunes; Fajardo, 2018; Minkal; Ahuja; Bhatt, 2018). No entanto, durante o processo de complexação polieletrólítica, a interação eletrostática gradual entre QT e Pct resulta na quebra das ligações de hidrogênio intra e inter-cadeias e, como consequência, a estrutura cristalina dos polissacarídeos puros é perdida (Minkal2018). Por outro lado, quando diferentes proporções entre os polissacarídeos são utilizadas no preparo do PEC, algumas das cadeias poliméricas não interagem completamente e as ligações de hidrogênio mencionadas podem permanecer durante e após a complexação (Fajardo *et al.*, 2010b; Schnell *et al.*, 2017). Tendo em vista que a Pct é o polissacarídeo mais cristalino na composição dos hidrogéis, a presença de alguns picos difratométricos desse polissacarídeo nos padrões de DRX dos hidrogéis é esperada (Achari *et al.*, 2019; Fajardo *et al.*, 2010b; Schnell *et al.*, 2017). As ligações de hidrogênio entre os polissacarídeos podem, ainda, ser restabelecidas à medida que as cadeias são aproximadas por conta da reticulação física e a formação dos pares iônicos durante a complexação polieletrólítica (Achari *et al.*, 2019).

Todos os aspectos citados podem explicar os picos difratométricos da QT e Pct nos difratogramas dos hidrogéis preparados. De fato, tais picos são observados nos hidrogéis contendo uma razão mássica QT:Pct de 2:1, 3:1, 1:2 e 1:3, onde a complexação polieletrólítica é mais eficiente e, portanto, as cadeias poliméricas mais próximas, independentemente do método de preparo (convencional ou semidissolução/acidificação). Nesse cenário, na rede polimérica dos hidrogéis preparados com a razão QT:Pct de 1:1, as cadeias estão pouco empacotadas e muito distantes para interagir por ligações de hidrogênio devido à baixa eficiência do processo de complexação polieletrólítica nessa condição. Logo, nesses hidrogéis, a organização da rede polimérica é menor. Como resultado, poucos picos difratométricos (incluindo dos polissacarídeos puros) podem ser observados nos seus difratogramas (**Figura 51**). Em tais hidrogéis, o novo pico em 2θ próximo à 23° é, provavelmente, devido a zonas mais ordenadas formadas pela complexação polieletrólítica entre QT e

Pct. Claramente, a composição dos hidrogéis influencia a estrutura cristalina e os padrões de DRX desses materiais.

Apesar de todas as similaridades entre os difratogramas dos hidrogéis preparados, o perfil difratométrico desses materiais também apresenta importantes diferenças. De acordo com a **Figura 51**, os difratogramas dos hidrogéis PEC-vap possuem picos de difração em 2θ próximos à 12° , 19° , 30° e 35° que não estão presentes nos difratogramas dos hidrogéis PEC-conv. Esses picos estão associados com a presença de regiões altamente ordenadas na matriz dos hidrogéis PEC-vap preparados pelo método de semidissolução/acidificação proposto neste estudo, como previamente inferido a partir das análises de térmicas e de FTIR. Tais regiões surgem da eficiente complexação polieletrólítica entre QT e Pct associada à atração eletrostática entre os grupos carregados dos polissacarídeos e a formação dos pares iônicos, como previamente especulado. Adicionalmente, a presença de vários picos difração indica que as zonas ordenadas na matriz dos hidrogéis PEC-vap possuem diferentes tamanhos. Essas diferenças na estrutura interna dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv, provavelmente, afetam a densidade de reticulação desses materiais. Para investigar essa hipótese, a densidade de reticulação dos hidrogéis foi mensurada utilizando o método descrito no Capítulo 3 desta Tese. Os resultados obtidos para todos hidrogéis preparados com diferentes razões mássicas entre QT e Pct estão sumarizados na **Tabela 17**. De acordo com os resultados, os hidrogéis PEC-vap possuem uma maior densidade de reticulação do que os hidrogéis PEC-conv.

Tabela 17. Densidade de reticulação dos hidrogéis PEC-conv e PEC-vap.

Razão QT:Pct (m:m)	Hidrogel	
	PEC-conv	PEC-vap
1:1	$90,00 \pm 1,20 \text{ mol m}^{-3}$	$107,00 \pm 1,00 \text{ mol m}^{-3}$
2:1	$116,30 \pm 6,00 \text{ mol m}^{-3}$	$159,32 \pm 0,22 \text{ mol m}^{-3}$
3:1	$120,00 \pm 1,20 \text{ mol m}^{-3}$	$181,00 \pm 19,00 \text{ mol m}^{-3}$
1:2	$113,00 \pm 1,00 \text{ mol m}^{-3}$	$136,00 \pm 7,00 \text{ mol m}^{-3}$
1:3	$115,00 \pm 1,02 \text{ mol m}^{-3}$	$142,00 \pm 3,00 \text{ mol m}^{-3}$

Obviamente, a composição dos hidrogéis influencia a densidade de reticulação dos mesmos. Sucintamente, uma maior densidade de reticulação foi observada para os hidrogéis preparados com uma maior quantidade de QT em sua composição. Essa tendência está relacionada à equivalência entre os grupos amina e carboxila ionizados, onde o aumento na quantidade de QT a favorece (**Tabela 13**) e resulta em uma complexação polieletrólítica mais eficiente. Apesar disso, os hidrogéis com mais Pct na composição (hidrogéis com uma razão QT/Pct de 1:2 e 1:3) apresentaram uma densidade de reticulação maior que os hidrogéis preparados com a mesma quantidade de QT e Pct (razão QT/Pct igual a 1:1), onde a equivalência entre os grupos carregados é maior. Essa constatação fortalece a hipótese de que o aumento de Pct na composição dos hidrogéis favorece o estabelecimento de ligações de hidrogênio entre as cadeias dos polissacarídeos, beneficiando o processo de complexação polieletrólítica. Consequentemente, esses hidrogéis possuem uma maior densidade de reticulação. Apesar disso, o aumento da quantidade de QT na composição dos hidrogéis favorece a complexação polieletrólítica e o aumento na densidade de reticulação dos hidrogéis, provavelmente, porque a equivalência entre os grupos carregados possui um efeito benéfico à complexação polieletrólítica entre QT e Pct maior do que a presença de ligações de hidrogênio entre as cadeias. De maneira geral, todas essas conclusões são fortalecidas pelos resultados das análises de FTIR, DSC, TG e DRX.

Portanto, todas as análises de caracterização efetuadas revelaram que os hidrogéis PEC-vap possuem maior estabilidade térmica e cristalinidade (ou seja, ordenamento) do que os hidrogéis PEC-conv. Essas características afetam outras propriedades desses materiais, como, por exemplo, propriedades mecânicas, absorção de líquido (intumescimento) e estabilidade. Essas propriedades serão avaliadas nas próximas seções deste Capítulo.

6.3.2.1. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos hidrogéis PEC-vap foi investigada por meio de análises de extensão. Infelizmente, os hidrogéis PEC-conv preparados pelo método convencional foram recuperados como agregados heterogêneos

muito frágeis e facilmente quebrados durante sua manipulação. Como resultado, a análise de extensão dos hidrogéis PEC-conv não foi realizada. Dentre as várias propriedades mecânicas passíveis de análise, somente o módulo de Young, a tensão de ruptura (T_r) e o percentual de elongação máxima no momento da ruptura (E_L) foram determinados. Os valores dessas propriedades estimadas para os hidrogéis PEC-vap estão sumarizados na **Tabela 18**. Como é possível constatar a partir da análise dos resultados obtidos, os valores de todas as propriedades mecânicas determinadas dependem da composição e densidade de reticulação dos hidrogéis. Por exemplo, hidrogéis constituídos com uma maior quantidade de QT possuem os maiores valores do módulo de Young e T_r , ao mesmo tempo em que apresentam os menores E_L . Em oposição, o aumento na quantidade de Pct na composição dos hidrogéis diminui os valores do módulo de Young e T_r , ou seja, a matriz desses materiais se torna mais frágil. Todos esses resultados são facilmente racionalizados considerando a densidade de reticulação dos materiais preparados (**Tabela 17**). De maneira geral, a matriz dos hidrogéis com maior densidade de reticulação suporta uma grande quantidade de estresse por conta dos diversos pontos de reticulação que unem firmemente as cadeias poliméricas (Jamróz *et al.*, 2021). Logo, esses hidrogéis possuem os maiores valores do módulo de Young e T_r . Porém, a matriz polimérica mais reticulada é menos flexível, já que a movimentação das cadeias poliméricas é restrita pelos pontos de reticulação. Consequentemente, esses hidrogéis possuem baixos valores para E_L . Portanto, a matriz dos hidrogéis com uma menor densidade de reticulação apresenta uma maior flexibilidade e maiores valores para E (Jamróz *et al.*, 2021).

Tabela 18. Propriedades mecânicas dos hidrogéis PEC-vap preparados.

Razão QT:Pct (m:m)	Propriedades mecânicas		
	Módulo de Young (kPa)	T_r (kPa)	E_L (%)
1:1	100,00 ± 2,00	1,72 ± 0,51	1,90 ± 0,61
2:1	588,00 ± 8,00	6,00 ± 1,23	1,02 ± 0,10
3:1	980,00 ± 11,00	9,89 ± 2,41	0,98 ± 0,12
1:2	400,01 ± 23,00	4,40 ± 1,01	1,10 ± 0,10
1:3	335,84 ± 40,21	4,03 ± 2,00	1,20 ± 0,15

6.3.2.2. Intumescimento

Como demonstrado nesse Capítulo, os hidrogéis PEC-vap e PEC-conv possuem distintas matrizes poliméricas com estruturas internas específicas a cada material devido ao respectivo método de preparo. Um simples método para ressaltar e investigar essas diferenças é através da análise da capacidade de absorção de líquido e intumescimento desses materiais em diferentes condições de pH e força iônica. Portanto, o grau de intumescimento máximo dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv foi primeiramente investigado em água e os resultados dessas análises são mostrados na **Figura 52**.

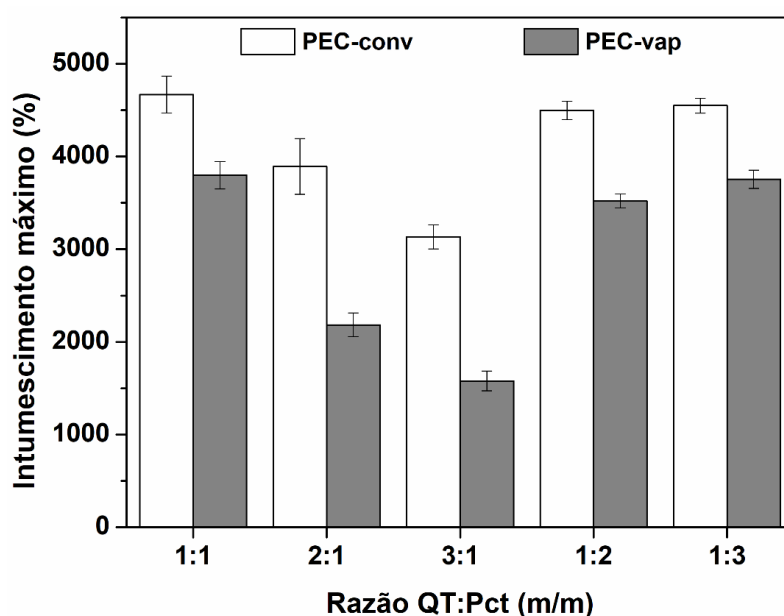


Figura 52. Grau de intumescimento máximo dos hidrogéis PEC-conv e PEC-vap preparados com diferentes razões mássicas QT:Pct em água destilada.

De acordo com os dados apresentados na **Figura 52**, todos os hidrogéis PEC-conv e PEC-vap preparados são superabsorventes, como indicado pelo elevado grau de intumescimento ($> 1000\%$) desses materiais, sendo esse um comportamento típico de hidrogéis baseados em PEC (Guilherme *et al.*, 2015). De forma genérica, o intumescimento de hidrogéis constituídos por polissacarídeos depende da hidrofilicidade da matriz polimérica e de sua densidade de reticulação (Caldas *et al.*, 2021). Esses dois fatores são

responsáveis pela absorção de líquido de matrizes poliméricas explicam os diferentes graus de intumescimento observados para os hidrogéis PEC-vap e PEC-conv. Como verificado, os hidrogéis PEC-conv apresentaram maior intumescimento do que os hidrogéis PEC-vap, independentemente de sua composição. Esse resultado é uma consequência direta dos diferentes métodos de preparo desses materiais. No método de semidissolução/acidificação, a complexação polieletrólítica entre os grupos carregados é mais eficiente e menos grupos funcionais estão disponíveis para interagir com as moléculas de água. Ainda, por conta da eficiente complexação polieletrólítica, os hidrogéis preparados por esse método possuem uma maior densidade de reticulação do que os materiais preparados pelo método convencional. Logo, os hidrogéis PEC-vap intumescem em uma menor escala do que os hidrogéis PEC-conv. Os resultados das análises de intumescimento indicam claramente as diferenças entre os processos de complexação polieletrólítica no método de semidissolução/acidificação e no método convencional.

Como observado na **Figura 52**, o intumescimento máximo dos hidrogéis também depende da sua composição. Em geral, a maior quantidade de QT nos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv diminui o intumescimento máximo observado para esses materiais. Nessas condições, a quantidade de grupos amina e carboxila ionizados é mais equivalente (**Tabela 13**), um comportamento que beneficia a complexação polieletrólítica entre QT e Pct e resulta em hidrogéis com maior densidade de reticulação (**Tabela 17**). Portanto, esses hidrogéis apresentam uma limitada expansão da matriz polimérica e baixa capacidade de absorção de líquido (Ganguly *et al.*, 2018). Por sua vez, os hidrogéis preparados com uma maior quantidade de Pct apresentaram um intumescimento máximo menor do que os hidrogéis constituídos com a mesma quantidade de QT e Pct (razão mássica QT:Pct igual a 1:1), uma vez que esses hidrogéis possuem uma maior densidade de reticulação (**Tabela 17**).

Outro fator que influencia o intumescimento máximo de hidrogéis formados por complexação polieletrólítica entre polissacarídeos com cargas opostas é o pH do meio, visto que esse fator afeta a estabilidade dos pares iônicos formados entre os grupos carregados (Gierszewska; Ostrowska-Czubenko; Chrzanowska, 2018b). Dessa forma, o intumescimento máximo dos

hidrogéis PEC-vap e PEC-conv em diferentes condições de pH (pH 2–12) foi investigado. Os resultados desses experimentos estão descritos na **Figura 53**. De acordo com os dados experimentais, os hidrogéis PEC-vap possuem um menor intumescimento máximo do que os hidrogéis PEC-conv em todas as condições de pH testadas. Novamente, esse comportamento está relacionado com a maior densidade de reticulação dos hidrogéis PEC-vap que restringe a expansão da matriz polimérica e reduz a sua capacidade de absorção de líquido. Ademais, os resultados obtidos indicam que os pares iônicos, que atuam como pontos de reticulação da rede polimérica, presentes na estrutura dos hidrogéis PEC-vap exibem uma maior estabilidade à variação de pH. Isso ocorre por causa da eficiente complexação polieletrólítica entre os grupos carregados da QT e Pct no método de semidissolução/acidificação, onde as interações eletrostáticas são máximas e as cadeias poliméricas podem atingir a conformação e empacotamento mais estável do ponto de vista termodinâmico. É claro que a maior densidade de reticulação dos hidrogéis PEC-vap restringe o influxo de líquido e dos íons presentes no meio de intumescimento (H^+ ou OH^-) em direção à matriz polimérica. Por conseguinte, os pares iônicos no interior dos hidrogéis PEC-vap (ou seja, no *bulk* dos materiais) não são facilmente desestabilizados, como ocorre nos hidrogéis PEC-conv. Esse é outro fator contribuinte para o baixo intumescimento máximo observado para os hidrogéis PEC-vap nos pHs testados.

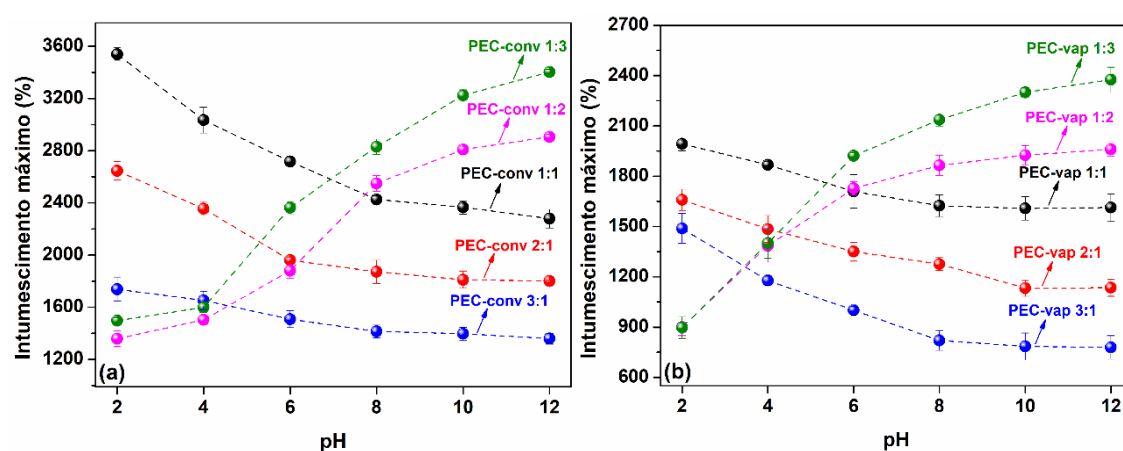


Figura 53. Intumescimento máximo dos hidrogéis PEC-conv (a) e PEC-vap (b) em água destilada com diferentes condições de pH.

Além das particularidades estruturais dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv, o intumescimento máximo desses materiais em diferentes pHs também é influenciado pela sua composição. Como observado na **Figura 53**, a razão mássica entre QT e Pct possui o mesmo efeito no intumescimento de ambos hidrogéis preparados quando o pH do meio de intumescimento varia. Nos hidrogéis preparados com uma maior quantidade de QT, o intumescimento máximo diminuiu à medida que o pH do meio aumentou de pH 2 até pH 12. Ao contrário, essa mesma variação de pH resultou em um aumento no intumescimento máximo alcançado pelos hidrogéis preparados com mais Pct. Esse comportamento contrastante ocorre por conta da proporção entre os grupos amina e carboxila na composição dos hidrogéis, que varia de acordo com a razão mássica entre QT e Pct (**Tabela 13**). Nos hidrogéis preparados com excesso de QT, existe uma maior equivalência entre os grupos carregados. Porém, em uma condição de pH ácida ($\text{pH} < 4,0$), os grupos carboxílicos ionizados da Pct são protonados ($\text{pK}_a \sim 3,5$) (Opanasopit *et al.*, 2008). Nesse cenário, os grupos amina carregados positivamente livres na matriz polimérica geram uma força de repulsão cátion-cátion que promove a expansão da matriz polimérica (Gierszewska; Ostrowska-Czubenko; Chrzanowska, 2018b). Consequentemente, a absorção de líquido e intumescimento dos hidrogéis preparados com excesso de QT é maior em condições ácidas (He, Meng *et al.*, 2020). Quando o pH do meio de intumescimento aumenta ($\text{pH} \geq 4,0$), uma grande fração dos grupos amina da QT está em sua forma protonada ($\text{pK}_a \sim 6,2$) (Fajardo *et al.*, 2010b). Porém, nessa condição, os grupos carboxila da Pct também apresentam carga. Isto permite uma maior interação eletrostática entre esses grupos funcionais e culmina em um menor intumescimento. Comparativamente, nos hidrogéis preparados com excesso de Pct existe uma grande quantidade de grupos carboxila livres na matriz polimérica em comparação com os grupos amina. Assim, o aumento do pH do meio de intumescimento ($\text{pH} \geq 4,0$) induz a completa ionização dos grupos carboxila e a repulsão ânion-ânion resultante promove a expansão da matriz polimérica. Esse comportamento explica o maior intumescimento observado para os hidrogéis preparados com mais Pct nessas condições de pH (He, Meng *et al.*, 2020). Curiosamente, os hidrogéis preparados com a mesma quantidade de QT e Pct (razão mássica igual a 1:1) também apresentaram um intumescimento maior em

pHs ácidos, provavelmente, por conta da maior quantidade de grupos amina nessa formulação em comparação com os hidrogéis contendo mais Pct.

O intumescimento dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv também foi investigado em soluções de cloreto de sódio (NaCl), onde a concentração desse sal foi variada. Normalmente, matrizes poliméricas formadas por complexação polieletrólítica são sensíveis à concentração de sais inorgânicos em virtude da desestabilização dos pares iônicos na presença dessas espécies (Fares *et al.*, 2019). Desse modo, esses experimentos proveem importantes informações sobre a estabilidade da matriz polimérica dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv. Os valores do intumescimento máximo dos hidrogéis em soluções com diferentes concentrações de NaCl ($10\text{--}200\text{ mmol L}^{-1}$) são apresentados na **Figura 54**. Em relação aos hidrogéis PEC-conv, o intumescimento máximo desses materiais aumentou até a concentração de NaCl de 50 mmol L^{-1} ; após essa concentração, o intumescimento máximo observado diminuiu (**Figura 54a**). Para os hidrogéis PEC-vap, o intumescimento máximo diminuiu ao passo que a concentração de NaCl no meio aumentou até a concentração de 150 mmol L^{-1} (**Figura 54b**). A partir dessa concentração, o intumescimento dos hidrogéis PEC-vap não foi alterado significativamente.

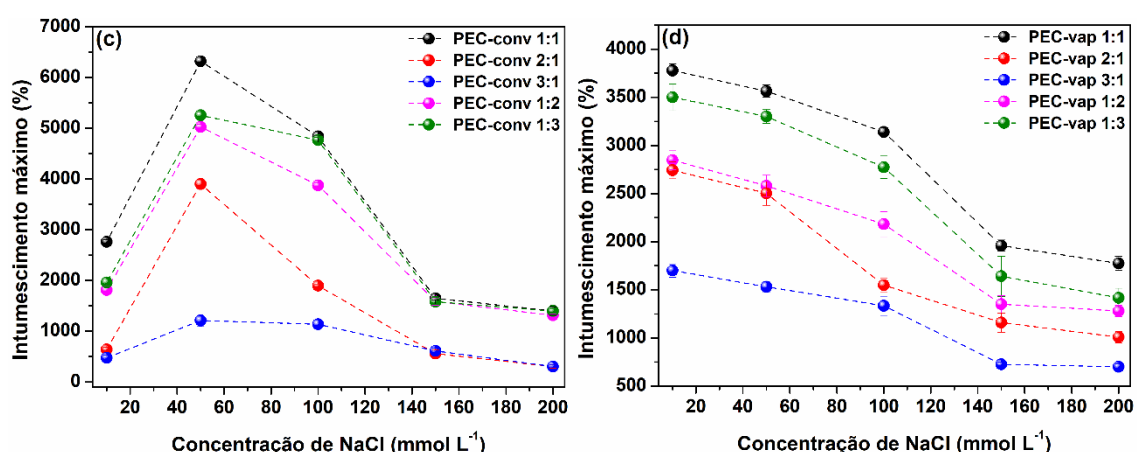


Figura 54. Intumescimento máximo dos hidrogéis PEC-conv (a) e PEC-vap (b) em diferentes concentrações de NaCl.

Como é possível verificar na **Figura 54**, cada tipo de hidrogel apresentou um comportamento distinto conforme a concentração de NaCl no meio. Esse comportamento está intimamente relacionado à estabilidade dos pares iônicos na matriz dos hidrogéis. Em um regime de baixa concentração salina, o sal presente na solução é dissociado em pequenos contra-íons, que são absorvidos pelo hidrogel. Essas espécies químicas são capazes de dopar os grupos carregados e promover a desestabilização dos pares iônicos da matriz polimérica (Liu; Parsons; Craig, 2020). Tipicamente, esse efeito é denominado de *salting-in* (Fares *et al.*, 2019). Como consequência direta da desestabilização dos pares iônicos, os pontos de reticulação física da matriz polimérica são reduzidos e uma maior quantidade de líquido é absorvido pelo hidrogel (Fares *et al.*, 2019). Contudo, a partir do aumento da concentração do sal no meio até um valor crítico, o intumescimento dos hidrogéis é influenciado pelo efeito *salting-out*. Nesse estágio, a solvatação dos íons salinos pelas moléculas de água é favorecida e as interações entre as cadeias poliméricas são dominantes na matriz dos hidrogéis (Fares *et al.*, 2019). Dessa maneira, a absorção de líquido e intumescimento dos hidrogéis são reduzidos significativamente no meio com uma grande concentração de NaCl. Levando em consideração esses aspectos, destaca-se a ausência de um maior intumescimento máximo dos hidrogéis PEC-vap nas soluções com baixa concentração de NaCl (**Figura 54b**). Como comentado anteriormente, esses hidrogéis apresentaram uma diminuição do intumescimento máximo ao passo que a concentração de NaCl no meio aumentou. Essa diminuição foi ainda verificada em comparação com o intumescimento máximo observado no meio sem adição de NaCl. Provavelmente, esse comportamento dos hidrogéis PEC-vap ocorre por causa da elevada densidade de reticulação desses materiais. Haja visto que a absorção de líquido nesses hidrogéis é menor, por conta da densidade de reticulação, os contra-íons no meio não são capazes de desestabilizar os pares iônicos na matriz dos hidrogéis PEC-vap e o efeito *salting-in* não é efetivo como nos hidrogéis PEC-conv (Liu; Parsons; Craig, 2020).

Finalmente, o efeito do tipo de sal no intumescimento máximo dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv também foi avaliado em soluções com diferentes concentrações de cloreto de cálcio (CaCl_2) e cloreto de alumínio (AlCl_3). Os

valores do intumescimento máximo dos hidrogéis nessas soluções foram comparados com os valores obtidos nas soluções de NaCl. É importante mencionar que as mesmas concentrações dos sais foram utilizadas (10–200 mmol L⁻¹). Resumidamente, o intumescimento máximo dos hidrogéis preparados apresentou o mesmo comportamento observado nas soluções de NaCl: hidrogéis PEC-conv intumescem consideravelmente até uma concentração crítica, onde o intumescimento decresce vertiginosamente, ao mesmo tempo que o aumento da concentração dos sais promove a diminuição do intumescimento dos hidrogéis PEC-vap. Novamente, esse comportamento decorre da densidade de reticulação dos hidrogéis e seu efeito nos processos de *salting-in* e *salting-out*. Com o intuito de aprofundar a comparação entre os resultados obtidos e adquirir mais informações sobre a sensibilidade dos hidrogéis ao tipo de sal e sua concentração, um fator de sensibilidade salina f foi utilizado. Em geral, valores de f maiores indicam uma maior capacidade de intumescimento e absorção de líquido no respectivo meio de intumescimento (Spagnol *et al.*, 2012). Os valores de f calculados estão sumarizados na **Tabela D.1** no **Apêndice D**. A partir da análise desses resultados, é possível constatar que os hidrogéis PEC-vap e PEC-conv possuem um maior intumescimento nas soluções contendo AlCl₃, seguido pelos meios contendo CaCl₂ e, por fim, NaCl. Evidentemente, esse comportamento está relacionado com a carga e o tamanho dos íons desses sais. Em solução, os íons Al³⁺ e Ca²⁺ possuem um menor tamanho (ou seja, menor raio iônico) e uma maior carga que os íons Na⁺. Assim, esses cátions trivalentes e divalentes são capazes de penetrar a matriz polimérica dos hidrogéis facilmente e promover a desestabilização dos pares iônicos (Spagnol *et al.*, 2012). Como resultado, os hidrogéis apresentam um maior intumescimento nas soluções contendo AlCl₃ e CaCl₂ do que NaCl. É importante mencionar que os íons Al³⁺ podem formar interagir com os grupos hidroxila e diminuir o intumescimento dos materiais, porém, isso não foi observado nesses experimentos. Apesar desse comportamento, os hidrogéis PEC-vap apresentaram uma menor sensibilidade aos sais do que os hidrogéis PEC-conv.

Em conjunto, todos esses resultados evidenciam as particularidades entre o processo de complexação polieletrólítica característica dos métodos de semidissolução/acidificação e método convencional. Essencialmente, o método

de semidissolução/acidificação resulta em hidrogéis com uma estrutura ordenada e com maior densidade de reticulação. Tal característica é decorrente do processo de complexação lento entre os polissacarídeos carregados que permite o empacotamento ordenado das cadeias poliméricas.

6.3.2.3. Estabilidade

A estabilidade dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv foi investigada por ensaios de perda de massa em PBS (pH 7,4). Os resultados estão descritos na **Figura 55**. Como esperado, os hidrogéis PEC-vap e PEC-conv exibiram diferentes comportamentos em relação a sua perda de massa. Por exemplo, os hidrogéis PEC-conv perderam mais da metade da sua massa inicial (> 50%) após 21 dias de incubação (**Figura 55a**). Nesse mesmo intervalo de tempo, os hidrogéis PEC-vap perderam uma pequena fração de sua massa inicial (< 25%) depois da sua incubação em PBS (**Figura 55b**). Em geral, os hidrogéis PEC-vap apresentaram uma menor perda de massa e, portanto, maior estabilidade, do que os hidrogéis PEC-conv. Esses resultados são facilmente racionalizados levando em consideração a densidade de reticulação dos hidrogéis. Os hidrogéis PEC-vap são constituídos por uma matriz mais reticulada do que os hidrogéis PEC-conv, logo, esses materiais exibem uma maior estabilidade contra a degradação promovida por hidrólise ou lixiviação das cadeias poliméricas (Nezhad-Mokhtari; Akrami-Hasan-Kohal; Ghorbani, 2020). Por sua vez, a perda de massa é menor e mais lenta nos hidrogéis constituídos com uma maior quantidade de QT. Em paralelo, os hidrogéis com excesso de Pct têm uma perda de massa mais acentuada. Mais uma vez, esses resultados são explicados pela densidade de reticulação dos materiais. Uma maior quantidade de QT na composição dos hidrogéis resulta em um aumento da densidade de reticulação dos materiais, ao passo que o excesso de Pct promove o efeito oposto (isto é, densidade de reticulação diminui, como observado na **Tabela 17**). Em síntese, os resultados desses experimentos indicam que os hidrogéis preparados, em especial, os hidrogéis PEC-vap, possuem um perfil de perda de massa prolongado. Essa característica é benéfica em diversas aplicações biomédicas, o que inclui o uso de tais materiais como sistemas de liberação controlada de fármacos (He, Meng *et al.*, 2020).

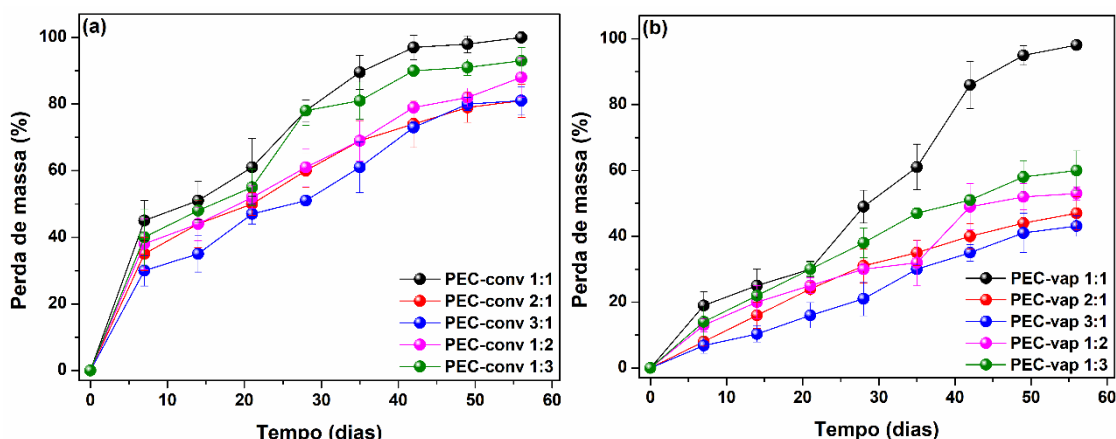


Figura 55. Curvas da perda de massa dos hidrogéis PEC-conv (a) e PEC-vap (b) em PBS (pH 7,4).

6.3.2.4. Encapsulação e liberação controlada de curcumina

Hidrogéis formados pela complexação polieletrólítica de polissacarídeos carregados com cargas opostas são materiais amplamente explorados como sistemas de liberação controlada de fármacos (Cardoso *et al.*, 2021). Nesse tipo de aplicação, a estrutura interna dos hidrogéis possui uma grande influência na cinética e no mecanismo de liberação do composto encapsulado, haja visto que as interações entre o composto e o meio são moduladas pela matriz polimérica do hidrogel (Cardoso *et al.*, 2021). Logo, as diferentes estruturas internas e os distintos graus de reticulação dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv acarretarão perfis de liberação únicos. Para verificar essa hipótese e investigar a potencial aplicação dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv como sistemas de liberação controlada, CUR foi encapsulada nesses materiais e sua liberação foi analisada. Para a encapsulação da CUR, amostras dos hidrogéis foram imersas em uma solução de CUR durante um intervalo de tempo (24 h) e secas. Portanto, as moléculas de CUR são sorvidas pelos hidrogéis e mantidas na matriz polimérica por meio de ligações de hidrogênio (ou interações hidrofóbicas) com os grupos funcionais livres da matriz polimérica. A partir desse processo de encapsulação, diferentes quantidades de CUR foram encapsuladas nos hidrogéis, como descrito na **Tabela 19**. Sucintamente, uma menor quantidade de CUR foi encapsulada nos hidrogéis PEC-vap em comparação com os hidrogéis PEC-conv. Isso ocorre, pois, os hidrogéis PEC-vap possuem uma maior densidade de

reticulação e a expansão de sua matriz polimérica é limitada. Consequentemente, a absorção da solução de CUR é menor nesses hidrogéis e a encapsulação das moléculas de CUR é inferior aos hidrogéis PEC-conv, que apresentam um maior intumescimento e contato com a solução. Além disso, a maior densidade de reticulação dos hidrogéis PEC-vap indica que a maioria dos grupos funcionais nesses hidrogéis estão envolvidos na formação dos pares iônicos, logo, a disponibilidade de tais grupos para interagir com as moléculas de CUR é menor. Por fim, a influência da composição dos hidrogéis na quantidade de CUR encapsulada nos hidrogéis também depende da densidade de reticulação: a encapsulação de CUR é menor nos hidrogéis com maior densidade de reticulação (**Tabela 17**).

Tabela 19. Quantidade de CUR encapsulada nos hidrogéis PEC-conv e PEC-vap.

Razao QT:Pct (m:m)	Hidrogel	
	PEC-conv	PEC-vap
1:1	20,08 ± 1,21 mg g ⁻¹	18,00 ± 1,20 mg g ⁻¹
2:1	18,56 ± 1,50 mg g ⁻¹	15,00 ± 2,01 mg g ⁻¹
3:1	18,50 ± 0,60 mg g ⁻¹	13,05 ± 1,70 mg g ⁻¹
1:2	19,01 ± 2,00 mg g ⁻¹	17,23 ± 0,60 mg g ⁻¹
1:3	19,30 ± 1,10 mg g ⁻¹	17,60 ± 2,80 mg g ⁻¹

A quantidade de CUR liberada dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv foi avaliada em PBS (pH 7,4) e na temperatura constante de 37 °C. Os resultados são apresentados na **Figura 56**. De acordo com os resultados obtidos, os hidrogéis PEC-vap e PEC-conv exibiram diferentes perfis de liberação da CUR, provavelmente, por conta das diferenças entre as suas estruturas internas. De maneira geral, a taxa de liberação da CUR é menor nos hidrogéis PEC-vap do que nos hidrogéis PEC-conv. Como observado, uma grande quantidade de CUR é liberada dos hidrogéis PEC-conv (cerca de 51% do total encapsulado) em um curto intervalo de tempo após o início dos experimentos (6h). Nesse mesmo intervalo, apenas uma pequena fração de CUR é liberada (cerca de 25% do total encapsulado) dos hidrogéis PEC-vap. Esse comportamento foi observado para todas as composições e diferentes razões mássicas QT:Pct. Dessa forma,

verifica-se que os hidrogéis PEC-vap evitaram a liberação imediata de uma grande quantidade de CUR em um curto tempo. Ao contrário, esse comportamento de liberação imediata da CUR foi observado para os hidrogéis PEC-conv. Portanto, os resultados experimentais descritos na **Figura 56** demonstram que os hidrogéis PEC-vap são capazes de sustentar a liberação de CUR por um longo período. Assim, assegura-se que o fármaco encapsulado (neste estudo, CUR) não perca sua efetividade devido à redistribuição sistêmica e impede o excesso do fármaco no local de aplicação do hidrogel, o que pode ocasionar uma ação inespecífica (Lemos; de Souza; Fajardo, 2021).

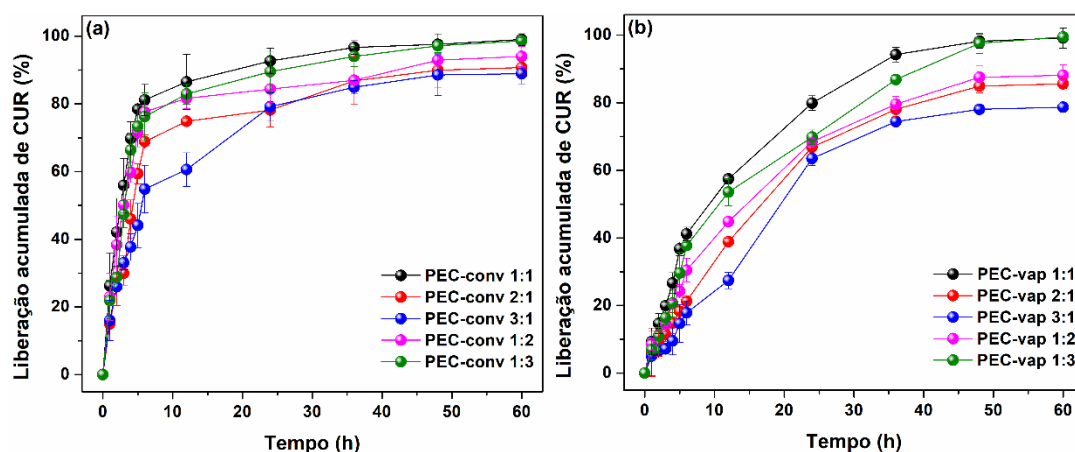


Figura 56. Liberação de CUR dos hidrogéis PEC-conv (a) e PEC-vap (b) em PBS (pH 7,4) na temperatura constante de 37 °C.

Evidentemente, a liberação de CUR dos hidrogéis preparados é dependente da hidrofiliicidade e intumescimento das matrizes poliméricas. Como verificado nos ensaios de liberação, a cinética de liberação de CUR é lenta nos hidrogéis PEC-vap e muito rápida para os hidrogéis PEC-conv. Por conta da maior densidade de reticulação observada nos hidrogéis PEC-vap, a expansão e intumescimento da matriz polimérica desses materiais são limitadas. Como resultado, a absorção do meio é menor e, por conseguinte, uma pequena quantidade de CUR é liberada dos hidrogéis PEC-vap (Tan; Ebrahimi; Langrish, 2019). Por sua vez, conforme o tempo de contato dos hidrogéis com o meio aumenta, uma maior quantidade de CUR é liberada. Em contrapartida, haja visto que os hidrogéis PEC-conv apresentam uma menor densidade de reticulação, a

matriz polimérica desses hidrogéis é capaz de absorver um grande volume de líquido, expandindo-se e facilitando a liberação de CUR para o meio (Tan; Ebrahimi; Langrish, 2019). Apesar da visível relação entre absorção de líquido e expansão da matriz polimérica dos hidrogéis e a liberação de CUR, a estrutura interna desses materiais também exerce influência no processo de liberação desse composto (Tenório-Neto *et al.*, 2017). De fato, a matriz polimérica dos hidrogéis PEC-vap é constituída por regiões altamente ordenadas formadas pela eficiente complexação polieletrólítica entre as cadeias de QT e Pct. Essas regiões atuam como barreiras físicas à difusão das moléculas de CUR para fora da matriz polimérica e, por consequência, tornam o processo de liberação desse composto mais lento nesses hidrogéis (Tenório-Neto *et al.*, 2017). Obviamente, esse efeito está intimamente associado com a influência do grau (e densidade) de reticulação dos hidrogéis PEC-vap no processo de liberação.

A estabilidade dos hidrogéis também é importante para os perfis de liberação de CUR observados na **Figura 56**. Os hidrogéis PEC-vap possuem uma maior estabilidade do que os hidrogéis PEC-conv por causa de sua elevada densidade de reticulação. Como resultado, a desestabilização e degradação da matriz polimérica dos hidrogéis PEC-vap é lenta. Logo, a taxa de liberação de CUR dos hidrogéis PEC-vap é menor. Em oposição, os hidrogéis PEC-conv, constituídos por uma matriz polimérica com poucos pontos de reticulação física, são facilmente degradados e, assim, a liberação de CUR é acelerada e maior em um curto intervalo de tempo. Portanto, a liberação de CUR dos hidrogéis está claramente relacionada com a densidade de reticulação desses materiais. Essa associação é clara através da análise da composição dos hidrogéis na liberação de CUR. Em síntese, a liberação de CUR é menor nos hidrogéis com maior densidade de reticulação. Por exemplo, os hidrogéis PEC-vap e PEC-conv contendo um excesso de QT (razão mássica QT:Pct 3:1) exibiram a liberação de CUR mais lenta entre os hidrogéis preparados com diferentes razões QT:Pct. Contudo, independente da composição, os hidrogéis preparados pelo método de semidissolução/acidificação apresentaram um processo de liberação de CUR mais lento e controlado do que os hidrogéis obtidos através do método convencional.

Para avaliar o perfil de liberação de CUR dos hidrogéis é importante verificar e entender o mecanismo pelo qual ela é liberada. Para isso, a liberação de CUR dos hidrogéis PEC-vap e PEC-conv foi analisada pelos modelos cinéticos de ordem zero, primeira ordem, segunda ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas. Em geral, esses modelos cinéticos são amplamente utilizados na elucidação do mecanismo de liberação de fármacos de diferentes hidrogéis preparados a partir de polissacarídeos (Kuen; Masarudin, 2022). Todos os parâmetros cinéticos calculados, incluindo os coeficientes de determinação (R^2) para cada hidrogel e sua composição, estão sumarizados na **Tabela 20**.

Tabela 20. Parâmetros cinéticos da liberação de curcumina (CUR) dos hidrogéis PEC-conv e PEC-vap.

Hidrogel	Razão QT/Pct (m:m)	Modelos cinéticos										
		Ordem zero		Primeira ordem		Segunda ordem		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
		k_0	R^2	k_1	R^2	k_2	R^2	k_H	R^2	k_{KP}	N	R^2
PEC-vap	1:1	0,048	0,982	0,053	0,502	0,046	0,689	0,037	0,830	0,078	0,5	0,865
	2:1	0,033	0,984	0,060	0,781	0,043	0,700	0,030	0,970	0,079	0,5	0,680
	3:1	0,028	0,991	0,040	0,830	0,030	0,900	0,020	0,930	0,075	0,6	0,810
	1:2	0,039	0,980	0,043	0,391	0,032	0,591	0,026	0,621	0,080	0,6	0,490
	1:3	0,043	0,980	0,049	0,482	0,041	0,875	0,032	0,854	0,081	0,6	0,710
PEC-conv	1:1	0,040	0,420	0,046	0,320	0,050	0,980	0,035	0,711	0,030	0,4	0,860
	2:1	0,036	0,561	0,036	0,400	0,040	0,990	0,027	0,800	0,014	0,5	0,890
	3:1	0,036	0,740	0,035	0,600	0,039	0,995	0,025	0,930	0,013	0,5	0,960
	1:2	0,032	0,462	0,035	0,300	0,046	0,992	0,026	0,740	0,018	0,5	0,850
	1:3	0,037	0,401	0,030	0,210	0,046	0,996	0,027	0,700	0,021	0,4	0,840

Analisando os parâmetros cinéticos apresentados na **Tabela 20**, é possível perceber que a liberação de CUR dos hidrogéis PEC-vap é mais bem descrita pelo modelo de ordem zero ($R^2 > 0,970$). O modelo de segunda ordem descreve melhor a liberação de CUR dos hidrogéis PEC-conv ($R^2 > 0,980$). Essa tendência é independente da razão mássica QT:Pct e depende somente do método de preparo dos hidrogéis (semidissolução/acidificação ou convencional). De modo geral, a cinética de liberação de ordem zero indica que a liberação de CUR depende apenas do tempo de contato do hidrogel com o meio de liberação. Nesse cenário, a difusão das moléculas de CUR para o meio é proporcional às mudanças na superfície dos hidrogéis, incluindo intumescimento (Thakur *et al.*,

2019). Considerando os hidrogéis PEC-vap, esses materiais são constituídos por uma matriz polimérica densamente reticulada e com várias regiões altamente ordenadas que dificultam a liberação de CUR. Ainda, a elevada estabilidade desses hidrogéis também dificulta a liberação de CUR. Todos esses efeitos são responsáveis pela cinética de ordem zero observada para os hidrogéis PEC-vap. A liberação de CUR dos hidrogéis PEC-conv é descrita pelo modelo de segunda ordem e indica que a liberação de CUR desses hidrogéis depende de uma série de eventos que englobam a desorção de CUR da superfície, intumescimento e erosão, como também, a difusão das moléculas de CUR para fora da matriz polimérica (Gerola *et al.*, 2015). Novamente, a densidade de reticulação dos hidrogéis exerce uma grande influência na liberação de CUR, como é possível verificar por meio da análise das constantes cinéticas (k_0 e k_2). Menores constantes foram verificadas para os hidrogéis PEC-vap do que para os hidrogéis PEC-conv. Uma vez que os hidrogéis PEC-vap possuem uma maior densidade de reticulação, as constantes cinéticas da liberação são menores para esses hidrogéis. Finalmente, em relação à composição dos hidrogéis, os materiais com maior densidade de reticulação exibiram uma liberação de CUR mais lenta (**Tabela 20**).

Levando em consideração todos os resultados obtidos, os hidrogéis PEC-vap são capazes de controlar eficientemente a liberação de CUR e prolongar o seu tempo de liberação. Esse comportamento não foi verificado para os hidrogéis PEC-conv, onde uma grande quantidade de CUR foi liberada rapidamente no início dos experimentos. Essas diferenças são resultado das distintas estruturas internas desses hidrogéis proporcionadas pelos diferentes métodos de preparo utilizados. Como verificado pelas análises de caracterização, o método de semidissolução/acidificação resultou em hidrogéis PEC-vap com uma estrutura interna organizada e com grande grau de reticulação. Essas características são diretamente responsáveis pela liberação lenta de CUR dos hidrogéis PEC-vap por um mecanismo que segue uma cinética de ordem zero, onde a taxa de liberação do composto encapsulado depende somente do tempo de contato com o meio de liberação e, por conta disso, é extremamente atrativa para potenciais sistemas de liberação controlada (Gerola *et al.*, 2015).

6.4. Conclusão

Hidrogéis de quitosana (QT) e pectina (Pct), com diferentes formulações, foram preparados por meio da complexação polieletrólítica entre esses polissacarídeos usando o método de semidissolução/acidificação proposto. Nesse método, a QT é dispersa na solução de Pct formando uma mistura heterogênea que é submetida a uma atmosfera de ácido acético. Esse tratamento promove a dissolução e protonação da QT que, gradualmente, interage eletrostaticamente com a Pct até formar o complexo polieletrólítico e, por fim, o hidrogel (PEC-vap). Além disso, complexos polieletrólíticos entre QT e Pct formados pelo método convencional, baseado na simples mistura das soluções desses polissacarídeos, também foram preparados (PEC-conv). Esses materiais foram comparados com os hidrogéis PEC-vap por diversas técnicas de caracterização. De acordo com as técnicas de caracterização, os hidrogéis PEC-vap possuem uma rede polimérica estável formada por pontos de reticulação física devido às fortes interações eletrostáticas entre QT e Pct. Aparentemente, essas interações são mais eficientes nos hidrogéis PEC-vap do que nos materiais PEC-conv. No método de semidissolução/acidificação, a interação eletrostática entre os grupos carregáveis da QT e Pct ocorre de forma lenta e gradual com a dissolução da QT devido a difusão de ácido acético na mistura. Como resultado, a complexação polieletrólítica ocorre de forma prolongada, possibilitando uma maior organização das cadeias termodinamicamente favorável. Portanto, esse processo gera um hidrogel muito homogêneo e estável. Em contrapartida, o método convencional gera produtos cinéticos e a interação entre a QT e Pct é pouco eficiente, pois, o contato entre os polissacarídeos é restrito por conta da formação de armadilhas cinéticas. Assim, os complexos polieletrólíticos obtidos por esse método são muito heterogêneos e pouco estáveis.

Como consequência desse tipo de topologia, os hidrogéis PEC-vap preparados pelo método de semidissolução/acidificação são capazes de promover a liberação lenta e prolongada de curcumina, a qual foi utilizada como fármaco modelo. Por meio das análises cinéticas, foi possível constatar que a cinética de liberação desse fármaco dos hidrogéis PEC-vap é baseada na cinética de ordem zero. Portanto, a liberação de um fármaco desse tipo de

hidrogel depende somente do tempo de contato do mesmo com o meio de liberação. Além disso, esses hidrogéis possuem uma grande estabilidade mecânica visual, isto é, os hidrogéis PEC-vap podem ser manipulados facilmente sem nenhum sinal de dano a sua estrutura, logo, sugerindo uma grande estabilidade mecânica. Essa característica, por exemplo, é altamente desejada em potenciais curativos para o revestimento de ferimentos.

Capítulo 7 – Considerações finais

Hidrogéis formados com polissacarídeos possuem várias propriedades físico-químicas atrativas para seu uso como biomateriais. Haja visto que as propriedades desses materiais dependem de sua aplicação, a rota de reticulação empregada na obtenção dos hidrogéis é crucial. Assim, o desenvolvimento de novas rotas de reticulação química e física são fundamentais para contornar as desvantagens dos métodos tradicionais de reticulação ou introduzir novas propriedades úteis aos hidrogéis. Os estudos apresentados aqui convergem nessa linha de pesquisa. No Capítulo 2, um hidrogel de QT e PVA-MA foi preparado por meio da reticulação química baseada na reação de adição de aza-Michael usando H_3BO_3 como catalisador. Os resultados experimentais revelaram a viabilidade e simplicidade dessa abordagem. A perspectiva é que o hidrogel obtido possa ser utilizado como substrato de cultivo celular ou curativo por conta de sua grande capacidade de absorção de líquido e estabilidade mecânica. No Capítulo 3, um hidrogel de Pct funcionalizada com grupos tióis foi preparado, onde as cadeias poliméricas foram reticuladas por ligações dissulfeto induzidas pela ação de um agente oxidante. O hidrogel resultante é sensível à agentes redutores fisiológicos, degradando-se em sua presença, sugerindo o seu potencial na liberação controlada de fármacos, pois, regiões tumorais e de lesões possuem uma grande quantidade de agentes redutores fisiológicos. Já no Capítulo 4, um novo tipo de hidrogel formado *in situ* foi sintetizado, onde as cadeias dos polissacarídeos foram reticuladas por meio de ligações imina. A gelificação da solução precursora é extremamente veloz, sugerindo sua gelificação *in situ* após injeção dentro do corpo humano. Portanto, o hidrogel preparo é capaz de atuar como sistema de liberação local de fármacos sensível ao pH. Por fim, seguindo essa mesma linha de pesquisa, um hidrogel formado pela complexação polieletrólítica entre QT e Pct foi preparado utilizando o método de semidissolução/acidificação. Por meio dessa metodologia, hidrogéis robustos e estáveis foram preparados. Em geral, todos os estudos apresentados nesta Tese demonstraram a viabilidade das rotas de preparo de hidrogéis propostas. Cada hidrogel preparado apresenta características próprias que sugerem o seu uso como biomateriais, porém, com finalidades diferentes.

Referências

- ABBAS, Khawar *et al.* Design, characterization and pharmaceutical/pharmacological applications of ibuprofen conjugates based on hydroxyethylcellulose. **RSC Advances**, [s. l.], v. 7, n. 80, p. 50672–50679, 2017a.
- ABBAS, Khawar *et al.* Designing novel bioconjugates of hydroxyethyl cellulose and salicylates for potential pharmaceutical and pharmacological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 103, p. 441–450, 2017b.
- ABBASIAN, Mojtaba *et al.* **Scaffolding polymeric biomaterials: Are naturally occurring biological macromolecules more appropriate for tissue engineering?**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2019.
- ACHARI, Divya *et al.* Polyelectrolyte complex membranes made of chitosan—PSSAMA for pervaporation separation of industrially important azeotropic mixtures. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [s. l.], v. 78, p. 383–395, 2019.
- AERIDOU, Eleni *et al.* Advanced Functional Hydrogel Biomaterials Based on Dynamic B-O Bonds and Polysaccharide Building Blocks. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 3984–3996, 2020.
- AKHTAR, Muhammad Faheem; HANIF, Muhammad; RANJHA, Nazar Muhammad. Methods of synthesis of hydrogels ... A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 554–559, 2016.
- ARUKALAM, I. O. *et al.* Inhibition of mild steel corrosion in sulfuric acid medium by hydroxyethyl cellulose. **Chemical Engineering Communications**, [s. l.], v. 202, n. 1, p. 112–122, 2014.
- ARYA, Sagar S. *et al.* **Vanillin: a review on the therapeutic prospects of a popular flavouring molecule**. [S. l.]: Springer, 2021.
- BAIG, Muhammad Irshad *et al.* Sustainable Membrane Production through Polyelectrolyte Complexation Induced Aqueous Phase Separation. **Advanced Functional Materials**, [s. l.], v. 30, n. 5, 2020.
- BAKER, Alexander E.G.; TAM, Roger Y.; SHOICHET, Molly S. Independently Tuning the Biochemical and Mechanical Properties of 3D Hyaluronan-Based Hydrogels with Oxime and Diels-Alder Chemistry to Culture Breast Cancer Spheroids. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 4373–4384, 2017.
- BARHAM, Joshua P. *et al.* Dual Roles for Potassium Hydride in Haloarene Reduction: CSNAr and Single Electron Transfer Reduction via Organic Electron Donors Formed in Benzene. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 140, n. 36, p. 11510–11518, 2018.
- BASU, Probal; SAHA, Nabanita; SAHA, Petr. Swelling and rheological study of calcium phosphate filled bacterial cellulose-based hydrogel scaffold. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 137, n. 14, p. 1–14, 2020.

BAUER, Aline *et al.* Hydrogel substrate stress-relaxation regulates the spreading and proliferation of mouse myoblasts. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 62, p. 82–90, 2017.

BEAUMONT, Marco *et al.* Hydrogel-Forming Algae Polysaccharides: From Seaweed to Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 1027–1052, 2021.

BENTLEY, Michael D.; ROBERTS, Michael J.; HARRIS, J.Milton. Reductive Amination using Poly(Ethylene Glycol) Acetaldehyde Hydrate Generated in Situ: Applications to Chitosan and Lysozyme. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 87, n. 11, p. 1446–1449, 1998. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915506977>.

BERTSCH, Pascal *et al.* Colloidal hydrogels made of gelatin nanoparticles exhibit fast stress relaxation at strains relevant for cell activity. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 138, p. 124–132, 2022.

BLACKBURN, Richard S. Natural polysaccharides and their interactions with dye molecules: Applications in effluent treatment. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 38, n. 18, p. 4905–4909, 2004.

BRANCA, C. *et al.* Role of the OH and NH vibrational groups in polysaccharide-nanocomposite interactions: A FTIR-ATR study on chitosan and chitosan/clay films. **Polymer**, [s. l.], v. 99, p. 614–622, 2016.

BRAR, Vivekjot; KAUR, Gurpreet. Preparation and Characterization of Polyelectrolyte Complexes of Hibiscus esculentus (Okra) Gum and Chitosan. **International Journal of Biomaterials**, [s. l.], v. 2018, 2018.

CALDAS, Bárbara S. *et al.* Manufacturing micro/nano chitosan/chondroitin sulfate curcumin-loaded hydrogel in ionic liquid: A new biomaterial effective against cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 180, p. 88–96, 2021.

CAO, Lianqi *et al.* **Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2020.

CAO, Zhiwen *et al.* **PH- and enzyme-triggered drug release as an important process in the design of anti-tumor drug delivery systems**. [S. l.]: Elsevier Masson SAS, 2019.

CAO, Jing *et al.* Preparation of modified citrus pectin (MCP) using an advanced oxidation process with hydroxyl radicals generated by UV-H₂O₂. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 102, n. March 2019, p. 105587, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105587>.

CAO, Yu *et al.* Tunable keratin hydrogel based on disulfide shuffling strategy for drug delivery and tissue engineering. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 544, p. 121–129, 2019a.

CAO, Yu *et al.* Tunable keratin hydrogel based on disulfide shuffling strategy for drug delivery and tissue engineering. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 544, p. 121–129, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.02.049>.

CAO, Yu *et al.* Tunable keratin hydrogel based on disulfide shuffling strategy for drug delivery and tissue engineering. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 544, p. 121–129, 2019c.

CARDOSO, Valéria Maria de Oliveira *et al.* Rational design of nanocarriers based on gellan gum/retrograded starch exploiting polyelectrolyte complexation and ionic cross-linking processes: A potential technological platform for oral delivery of bevacizumab. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 66, 2021.

CARVALHO, Isadora C. *et al.* L-cysteine and poly-L-arginine grafted carboxymethyl cellulose/Ag-In-S quantum dot fluorescent nanohybrids for in vitro bioimaging of brain cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 133, p. 739–753, 2019.

CHAUDHURI, Mihir K. *et al.* Boric acid: A novel and safe catalyst for aza-Michael reactions in water. **Tetrahedron Letters**, [s. l.], v. 46, n. 48, p. 8329–8331, 2005.

CHAUDHURI, Ovijit *et al.* Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity. **Nature Materials**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 326–334, 2016.

CHEN, Junyi *et al.* All-Polysaccharide, Self-Healing Injectable Hydrogels Based on Chitosan and Oxidized Hydroxypropyl Polysaccharides. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 4261–4272, 2020a.

CHEN, Junyi *et al.* All-Polysaccharide, Self-Healing Injectable Hydrogels Based on Chitosan and Oxidized Hydroxypropyl Polysaccharides. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 4261–4272, 2020b.

CHEN, Junyi *et al.* All-Polysaccharide, Self-Healing Injectable Hydrogels Based on Chitosan and Oxidized Hydroxypropyl Polysaccharides. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 4261–4272, 2020c.

CHEN, Jun *et al.* Pectin Modifications: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 55, n. 12, p. 1684–1698, 2015.

CHEN, Pei *et al.* Thermomechanical-induced polyelectrolyte complexation between chitosan and carboxymethyl cellulose enabling unexpected hydrolytic stability. **Composites Science and Technology**, [s. l.], v. 189, 2020.

CHEN, Jinfeng *et al.* Thiolated citrus low-methoxyl pectin: Synthesis, characterization and rheological and oxidation-responsive gelling properties. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 181, n. October 2017, p. 964–973, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.053>.

CHEN, Junyi; ZHAI, Zhenghao; EDGAR, Kevin J. **Recent advances in polysaccharide-based in situ forming hydrogels**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2022.

CHOH, Sun Young; CROSS, Daisy; WANG, Chun. Facile synthesis and characterization of disulfide-cross-linked hyaluronic acid hydrogels for protein delivery and cell encapsulation. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1126–1136, 2011a.

CHOH, Sun Young; CROSS, Daisy; WANG, Chun. Facile synthesis and characterization of disulfide-cross-linked hyaluronic acid hydrogels for protein delivery and cell encapsulation. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1126–1136, 2011b.

CHOI, Joo Hee *et al.* Fast stress relaxing gellan gum that enhances the microenvironment and secreting function of bone mesenchymal stem cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 222, p. 2144–2157, 2022.

DALY, Andrew C. *et al.* **Hydrogel microparticles for biomedical applications**. [S. l.]: Nature Research, 2020.

DE FREITAS, Camila Fabiano *et al.* Curcumin and silver nanoparticles carried out from polysaccharide-based hydrogels improved the photodynamic properties of curcumin through metal-enhanced singlet oxygen effect. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 112, 2020.

DE JESUS, Sérgio S.; MACIEL FILHO, Rubens. **Are ionic liquids eco-friendly?**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2022.

DE OLIVEIRA, Fabíola Cristina *et al.* **Food Protein-polysaccharide Conjugates Obtained via the Maillard Reaction: A Review**. [S. l.]: Taylor and Francis Inc., 2016.

DE SOUZA, Jaqueline F.; DA SILVA, Gabriela T.; FAJARDO, André R. Chitosan-based film supported copper nanoparticles: A potential and reusable catalyst for the reduction of aromatic nitro compounds. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 161, p. 187–196, 2017a.

DE SOUZA, Jaqueline F.; DA SILVA, Gabriela T.; FAJARDO, André R. Chitosan-based film supported copper nanoparticles: A potential and reusable catalyst for the reduction of aromatic nitro compounds. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 161, p. 187–196, 2017b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.018>.

DEBELE, Tilahun Ayane *et al.* PH- and GSH-Sensitive Hyaluronic Acid-MP Conjugate Micelles for Intracellular Delivery of Doxorubicin to Colon Cancer Cells and Cancer Stem Cells. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 3725–3737, 2018.

DERKACH, Svetlana R. *et al.* Interactions between gelatin and sodium alginate: UV and FTIR studies. **Journal of Dispersion Science and Technology**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 690–698, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01932691.2019.1611437>.

DEV, A. *et al.* Nano-curcumin influences blue light photodynamic therapy for restraining glioblastoma stem cells growth. **RSC Advances**, [s. l.], v. 6, n. 97, p. 95165–95168, 2016.

DIMATTEO, Robert; DARLING, Nicole J.; SEGURA, Tatiana. **In situ forming injectable hydrogels for drug delivery and wound repair**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2018.

DU, Yihao *et al.* A solid-supported arylboronic acid catalyst for direct amidation. **Chemical Communications**, [s. l.], v. 55, n. 20, p. 2916–2919, 2019.

DUBEY, Vibhuti *et al.* Brinzolamide loaded chitosan-pectin mucoadhesive nanocapsules for management of glaucoma: Formulation, characterization and pharmacodynamic study. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 152, p. 1224–1232, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.219>.

DUCEAC, Ioana A. *et al.* All-polysaccharide hydrogels for drug delivery applications: Tunable chitosan beads surfaces via physical or chemical interactions, using oxidized pullulan. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 181, p. 1047–1062, 2021.

ENEV, Vojtěch *et al.* ATR-FTIR spectroscopy and thermogravimetry characterization of water in polyelectrolyte-surfactant hydrogels. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 575, n. April, p. 1–9, 2019.

FAJARDO, André R. *et al.* Development and application of chitosan/poly(vinyl alcohol) films for removal and recovery of Pb(II). **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 183, p. 253–260, 2012a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2011.12.071>.

FAJARDO, André R. *et al.* Polyelectrolyte complexes based on pectin-NH₂ and chondroitin sulfate. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 87, n. 3, p. 1950–1955, 2012b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.096>.

FAJARDO, André R. *et al.* Silver sulfadiazine loaded chitosan/chondroitin sulfate films for a potential wound dressing application. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 588–595, 2013a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.09.025>.

FAJARDO, André R. *et al.* Silver sulfadiazine loaded chitosan/chondroitin sulfate films for a potential wound dressing application. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 588–595, 2013b.

FAJARDO, André R. *et al.* Time- and pH-dependent self-rearrangement of a swollen polymer network based on polyelectrolytes complexes of chitosan/chondroitin sulfate. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 934–943, 2010a.

FAJARDO, André R. *et al.* Time- and pH-dependent self-rearrangement of a swollen polymer network based on polyelectrolytes complexes of

chitosan/chondroitin sulfate. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 934–943, 2010b.

FARES, Hadi M. *et al.* Swelling and Inflation in Polyelectrolyte Complexes. **Macromolecules**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 610–619, 2019.

FATHI, Ezatollah *et al.* Physically crosslinked polyvinyl alcohol-dextran blend xerogels: Morphology and thermal behavior. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 145–152, 2011.

FEJERSKOV, Betina *et al.* Engineering surface adhered poly(vinyl alcohol) physical hydrogels as enzymatic microreactors. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 4981–4990, 2012.

FILIPPOV, Andrei; ANTZUTKIN, Oleg N.; SHAH, Faiz Ullah. Understanding the Interaction of Boric Acid and CO₂ with Ionic Liquids in Aqueous Medium by Multinuclear NMR Spectroscopy. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 552–560, 2020.

FOX, S. Carter *et al.* Regioselective Esterification and Etherification of Cellulose: A Review. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1956–1972, 2011.

FRANCIS, Brian R.; WATKINS, Kevin; KUBELKA, Jan. Double hydrogen bonding between side chain carboxyl groups in aqueous solutions of poly (β -L-malic acid): Implication for the evolutionary origin of nucleic acids. **Life**, [s. l.], v. 7, n. 3, 2017.

FU, Lian Hua *et al.* **Multifunctional cellulose-based hydrogels for biomedical applications**. [S. l.]: Royal Society of Chemistry, 2019.

FU, Xiao *et al.* **Multi-Stimuli-Responsive Polymer Particles, Films, and Hydrogels for Drug Delivery**. [S. l.]: Elsevier Inc, 2018.

GANGULY, Sayan *et al.* Mechanically robust dual responsive water dispersible-graphene based conductive elastomeric hydrogel for tunable pulsatile drug release. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 42, p. 212–227, 2018.

GAO, Chengzhe; LIU, Shu; EDGAR, Kevin J. Regioselective chlorination of cellulose esters by methanesulfonyl chloride. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 193, p. 108–118, 2018.

GENG, Shiyu *et al.* Plasticizing and crosslinking effects of borate additives on the structure and properties of poly(vinyl acetate). **RSC Advances**, [s. l.], v. 7, n. 13, p. 7483–7491, 2017.

GENG, Shiyu; HAQUE, Md Minhaz Ul; OKSMAN, Kristiina. Crosslinked poly(vinyl acetate) (PVAc) reinforced with cellulose nanocrystals (CNC): Structure and mechanical properties. **Composites Science and Technology**, [s. l.], v. 126, p. 35–42, 2016a.

GENG, Shiyu; HAQUE, Md Minhaz Ul; OKSMAN, Kristiina. Crosslinked poly(vinyl acetate) (PVAc) reinforced with cellulose nanocrystals (CNC): Structure and

mechanical properties. **Composites Science and Technology**, [s. l.], v. 126, p. 35–42, 2016b.

GEORGE, Julian *et al.* Neural tissue engineering with structured hydrogels in CNS models and therapies. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 42, n. March 2019, p. 107370, 2020a.

GEORGE, Julian *et al.* **Neural tissue engineering with structured hydrogels in CNS models and therapies**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2020b.

GEROLA, Adriana P. *et al.* Synthesis and controlled curcumin supramolecular complex release from pH-sensitive modified gum-arabic-based hydrogels. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 115, p. 94519–94533, 2015.

GHOLAMALI, Iman. Stimuli-Responsive Polysaccharide Hydrogels for Biomedical Applications: a Review. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, [s. l.], 2019.

GIERSEWSKA, Magdalena; OSTROWSKA-CZUBENKO, Jadwiga; CHRZANOWSKA, Ewelina. pH-responsive chitosan/alginate polyelectrolyte complex membranes reinforced by tripolyphosphate. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 101, n. November 2017, p. 282–290, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.02.031>.

GIERSEWSKA, Magdalena; OSTROWSKA-CZUBENKO, Jadwiga; CHRZANOWSKA, Ewelina. pH-responsive chitosan/alginate polyelectrolyte complex membranes reinforced by tripolyphosphate. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 101, p. 282–290, 2018b.

GILJAN, Greta *et al.* Strong seasonal differences of bacterial polysaccharide utilization in the North Sea over an annual cycle. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 2333–2347, 2022.

GODOY-ALCÁNTAR, C.; YATSIMIRSKY, Anatoly K.; LEHN, J. M. Structure-stability correlations for imine formation in aqueous solution. **Journal of Physical Organic Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 10, p. 979–985, 2005.

GRINBERG, Valerij Y. *et al.* Binding affinity of thermoresponsive polyelectrolyte hydrogels for charged amphiphilic ligands. A DSC approach. **Langmuir**, [s. l.], v. 30, n. 14, p. 4165–4171, 2014.

GUILHERME, Marcos R. *et al.* **Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for application in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: A review**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2015.

HALIMEHJANI, Azim Ziyaei; GHOLAMI, Hadi; SAIDI, Mohammad R. Boric acid/glycerol as an efficient catalyst for regioselective epoxide ring opening by aromatic amines in water. **Green Chemistry Letters and Reviews**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–5, 2012.

HALL, Dennis G. Boronic acid catalysis. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 48, n. 13, p. 3475–3496, 2019.

HAMDAOUI, Lahcen El *et al.* Synthesis, characterization and pyrolysis kinetics of chitosan-n-phenylacetamide in an ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 10278–10292, 2021.

HASTUTI, Budi *et al.* Synthesis and Characterization Pectin-Carboxymethyl Chitosan crosslinked PEGDE as biosorbent of Pb(II) ion. *In:* , 2018. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. [S. l.]: Institute of Physics Publishing, 2018.

HE, Meng *et al.* Biocompatible and biodegradable chitosan/sodium polyacrylate polyelectrolyte complex hydrogels with smart responsiveness. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 155, p. 1245–1251, 2020.

HE, Jiahui *et al.* Conductive adhesive self-healing nanocomposite hydrogel wound dressing for photothermal therapy of infected full-thickness skin wounds. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 394, n. December 2019, p. 124888, 2020.

HU, Weikang *et al.* Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. **Biomaterials Science**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 843–855, 2019a.

HU, Weikang *et al.* **Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels**. [S. l.]: Royal Society of Chemistry, 2019b.

HUAMANI-PALOMINO, Ronny G. *et al.* Chemical modification of alginate with cysteine and its application for the removal of Pb(II) from aqueous solutions. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 129, p. 1056–1068, 2019.

ISHIHARA, Kazuaki; LU, Yanhui. Boronic acid-DMAPO cooperative catalysis for dehydrative condensation between carboxylic acids and amines. **Chemical Science**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 1276–1280, 2016.

JAMRÓZ, Ewelina *et al.* Composite biopolymer films based on a polyelectrolyte complex of furcellaran and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 274, 2021.

JIANG, Xueyu *et al.* Highly self-healable and injectable cellulose hydrogels via rapid hydrazone linkage for drug delivery and 3D cell culture. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 273, 2021.

KALLIOLA, Simo *et al.* Carboxymethyl Chitosan and Its Hydrophobically Modified Derivative as pH-Switchable Emulsifiers. **Langmuir**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. 2800–2806, 2018.

KAMOUN, Elbadawy A. *et al.* Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–14, 2015.

KATAOKA, Shimon *et al.* Fast and Reversible Cross-Linking Reactions of Thermoresponsive Polymers Based on Dynamic Dialkylaminodisulfide Exchange. **ACS Applied Polymer Materials**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 888–895, 2021.

KATUWAVILA, Nuwanthi P. *et al.* Alginate nanoparticles protect ferrous from oxidation: Potential iron delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 513, n. 1–2, p. 404–409, 2016.

KAUSHIK, Priyanka *et al.* Mixing ratio dependent complex coacervation: Versus bicontinuous gelation of pectin with in situ formed zein nanoparticles. **Soft Matter**, [s. l.], v. 14, n. 31, p. 6463–6475, 2018.

KHAN, Jawad Ahmad *et al.* Design and Characterization of PVA–Methacrylic Acid Based Smart Polymeric System for Controlled Release of Metoprolol. **Journal of Polymers and the Environment**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 556–568, 2017.

KUEN, Cha Yee; MASARUDIN, Mas Jaffri. **Chitosan Nanoparticle-Based System: A New Insight into the Promising Controlled Release System for Lung Cancer Treatment**. [S. l.]: MDPI, 2022.

KULKARNI, Abhijeet D. *et al.* Polyelectrolyte complexes: mechanisms, critical experimental aspects, and applications. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 44, n. 7, p. 1615–1625, 2016.

LACHIA, Mathilde *et al.* Ethyl-2-(2-chloroethyl)acrylate: A new very versatile α -cyclopropylester cation synthon. Efficient synthesis of cyclopropane ester derivatives by Michael addition-induced cyclization reaction. **Tetrahedron Letters**, [s. l.], v. 52, n. 25, p. 3219–3222, 2011.

LALL, Aastha *et al.* Nanoparticles and colloidal hydrogels of chitosan–caseinate polyelectrolyte complexes for drug-controlled release applications. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 16, p. 1–25, 2020.

LARA-ESPINOZA, Claudia *et al.* **Pectin and pectin-based composite materials: Beyond food texture**. [S. l.]: MDPI AG, 2018.

LÁZARO MARTÍNEZ, Juan Manuel *et al.* NMR characterization of hydrate and aldehyde forms of imidazole-2- carboxaldehyde and derivatives. **Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], v. 75, n. 10, p. 3208–3213, 2010.

LEE, Sang Hyub; SHIN, Se Ra; LEE, Dai Soo. Self-healing of cross-linked PU via dual-dynamic covalent bonds of a Schiff base from cystine and vanillin. **Materials and Design**, [s. l.], v. 172, 2019.

LE MOS, Thalia S.A.; DE SOUZA, Jaqueline F.; FAJARDO, André R. Magnetic microspheres based on pectin coated by chitosan towards smart drug release. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 265, 2021.

LESSA, Emanuele F. *et al.* Orange waste: A valuable carbohydrate source for the development of beads with enhanced adsorption properties for cationic dyes. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 157, p. 660–668, 2017.

LESSA, Emanuele F.; NUNES, Matheus L.; FAJARDO, André R. Chitosan/waste coffee-grounds composite: An efficient and eco-friendly adsorbent for removal of pharmaceutical contaminants from water. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 189, n. February, p. 257–266, 2018.

LI, De qiang *et al.* **Pectin in biomedical and drug delivery applications: A review**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2021.

LIN, Wei Chun *et al.* Large strain and fracture properties of poly(dimethylacrylamide)/silica hybrid hydrogels. **Macromolecules**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 2554–2563, 2010.

LIN, Charng Yu; BATTISTONI, Carly M.; LIU, Julie C. Redox-Responsive Hydrogels with Decoupled Initial Stiffness and Degradation. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 5270–5280, 2021.

LIU, He *et al.* A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. **RSC Advances**, [s. l.], v. 8, n. 14, p. 7533–7549, 2018.

LIU, Xia *et al.* Chemical and photochemical DNA “gears” reversibly control stiffness, shape-memory, self-healing and controlled release properties of polyacrylamide hydrogels. **Chemical Science**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 1008–1016, 2019.

LIU, Yawei *et al.* Thio-Michael addition of α,β -unsaturated amides catalyzed by Nmm-based ionic liquids. **RSC Advances**, [s. l.], v. 7, n. 68, p. 43104–43113, 2017.

LIU, Amin *et al.* Tunable Fast Relaxation in Imine-Based Nanofibrillar Hydrogels Stimulates Cell Response through TRPV4 Activation. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 3745–3755, 2020a.

LIU, Amin *et al.* Tunable Fast Relaxation in Imine-Based Nanofibrillar Hydrogels Stimulates Cell Response through TRPV4 Activation. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 3745–3755, 2020b.

LIU, Guangming; PARSONS, Drew; CRAIG, Vincent Stuart James. Re-entrant swelling and redissolution of polyelectrolytes arises from an increased electrostatic decay length at high salt concentrations. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 579, p. 369–378, 2020.

LOPALCO, Antonio *et al.* Boric Acid, a Lewis Acid With Unique and Unusual Properties: Formulation Implications. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 8, p. 2375–2386, 2020.

LOU, Junzhe *et al.* Stress relaxing hyaluronic acid-collagen hydrogels promote cell spreading, fiber remodeling, and focal adhesion formation in 3D cell culture. **Biomaterials**, [s. l.], v. 154, p. 213–222, 2018.

LOVE, Dillon *et al.* Catalyst-free, aza-Michael polymerization of hydrazides: Polymerizability, kinetics, and mechanistic origin of an α -effect. **Polymer Chemistry**, [s. l.], v. 10, n. 42, p. 5790–5804, 2019.

MACIEL, J.V. *et al.* Polysaccharides derived from natural sources applied to the development of chemically modified electrodes for environmental applications: A review. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 22, 2019.

MACKAYA-NAVARRO, Laura; CAMPOS-REQUENA, Víctor H. Mucoadhesive alginate synthesis: A multivariate calibration approach. **New Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 44, n. 46, p. 20267–20274, 2020.

MANOJ LALWANI, Suvesh; ENEH, Chikaodinaka I.; LUTKENHAUS, Jodie L. **Emerging trends in the dynamics of polyelectrolyte complexes**. [S. l.]: Royal Society of Chemistry, 2020.

MARTINS, Alessandro F. *et al.* Chitosan/iota-carrageenan and chitosan/pectin polyelectrolyte multilayer scaffolds with antiadhesive and bactericidal properties. **Applied Surface Science**, [s. l.], v. 502, n. September 2019, p. 144282, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144282>.

MINKAL; AHUJA, Munish; BHATT, D. C. Polyelectrolyte complex of carboxymethyl gum katira-chitosan: Preparation and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 106, p. 1184–1191, 2018.

MOHAMMED, Aiman Saleh A.; NAVEED, Muhammad; JOST, Norbert. **Polysaccharides; Classification, Chemical Properties, and Future Perspective Applications in Fields of Pharmacology and Biological Medicine (A Review of Current Applications and Upcoming Potentialities)**. [S. l.]: Springer, 2021.

MUNARIN, F.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 681–689, 2012.

MURAKAWA, Kohei *et al.* Polyelectrolyte complexation via viscoelastic phase separation results in tough and self-recovering porous hydrogels. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 7, n. 35, p. 5296–5305, 2019.

NAM, Sungmin *et al.* Varying PEG density to control stress relaxation in alginate-PEG hydrogels for 3D cell culture studies. **Biomaterials**, [s. l.], v. 200, p. 15–24, 2019.

NEZHAD-MOKHTARI, Parinaz; AKRAMI-HASAN-KOHAL, Mohammad; GHORBANI, Marjan. An injectable chitosan-based hydrogel scaffold containing gold nanoparticles for tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 154, p. 198–205, 2020.

NICHOLS, Brittany L.B. *et al.* Selective Oxidation of 2-Hydroxypropyl Ethers of Cellulose and Dextran: Simple and Efficient Introduction of Versatile Ketone

Groups to Polysaccharides. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 4835–4849, 2020.

NUNES, Cátia S. *et al.* Chitosan/chondroitin sulfate hydrogels prepared in [Hmim][HSO₄] ionic liquid. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 170, p. 99–106, 2017.

NYPELÖ, Tiina *et al.* **Review: Periodate oxidation of wood polysaccharides—Modulation of hierarchies**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2021.

OPANASOPIT, Praneet *et al.* Development and characterization of pectinate micro/nanoparticles for gene delivery. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 67–74, 2008.

OSTROWSKA-CZUBENKO, Jadwiga; GIERSEWSKA-DRUZYŃSKA, Magdalena. Effect of ionic crosslinking on the water state in hydrogel chitosan membranes. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 77, n. 3, p. 590–598, 2009.

OTONI, Caio G. *et al.* Charge Matters: Electrostatic Complexation As a Green Approach to Assemble Advanced Functional Materials. **ACS Omega**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 1296–1304, 2020.

PAN, Ruihao *et al.* Curcumin-polymer conjugates with dynamic boronic acid ester linkages for selective killing of cancer cells. **Polymer Chemistry**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 1321–1326, 2020.

PATENAUDE, Mathew *et al.* Tuning gelation time and morphology of injectable hydrogels using Ketone-Hydrazide cross-linking. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 781–790, 2014.

PEERS, S.; MONTEBAULT, A.; LADAVIÈRE, C. Chitosan hydrogels for sustained drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 326, n. June, p. 150–163, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.012>.

PEPPAS2016. [s. l.],

PERGUSHOV, Dmitry V.; MÜLLER, Axel H.E.; SCHACHER, Felix H. Micellar interpolyelectrolyte complexes. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 41, n. 21, p. 6888–6901, 2012.

PERTICI, Vincent *et al.* Degradable and Injectable Hydrogel for Drug Delivery in Soft Tissues. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 149–163, 2019.

PIAI, Juliana F.; RUBIRA, Adley F.; MUNIZ, Edvani C. Self-assembly of a swollen chitosan/chondroitin sulfate hydrogel by outward diffusion of the chondroitin sulfate chains. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 2601–2609, 2009.

PIĄTEK, Michał; LISOWSKI, Aleksander; LISOWSKA, Barbara. Application of titration methods for measuring the contents of ammonium nitrogen and volatile fatty acids in agricultural biogas plants. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 264, n. June, p. 38–42, 2017.

PRADO, Samira B.R. *et al.* Pectin Interaction with Immune Receptors is Modulated by Ripening Process in Papayas. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.

PRAGYA, Akanksha *et al.* Dynamic cross-linking of an alginate-acrylamide tough hydrogel system: time-resolved in situ mapping of gel self-assembly. **RSC Advances**, [s. l.], v. 11, n. 18, p. 10710–10726, 2021.

PUSKAS, Judit E.; SEO, Kwang Su; SEN, Mustafa Y. Green polymer chemistry: Precision synthesis of novel multifunctional poly(ethylene glycol)s using enzymatic catalysis. *In*: , 2011. **European Polymer Journal**. [S. l.: s. n.], 2011. p. 524–534.

QUADRADO, Rafael F.N.; FAJARDO, André R. Microparticles based on carboxymethyl starch/chitosan polyelectrolyte complex as vehicles for drug delivery systems. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 2183–2194, 2020.

RADI, Rafael; TRUJILLO, Madia. Special issue on “Free Radical and Redox Biochemistry of Thiols”. **Free Radical Research**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 123–125, 2016.

RAJABI, Mina *et al.* **Chitosan hydrogels in 3D printing for biomedical applications**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2021.

RAMIN, Beatriz B.S. *et al.* Chitosan/iota-carrageenan/curcumin-based materials performed by precipitating miscible solutions prepared in ionic liquid. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 290, 2019.

RANGANATHAN, Palraj *et al.* Biocompatible chitosan-pectin polyelectrolyte complex for simultaneous electrochemical determination of metronidazole and metribuzin. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 214, n. November 2018, p. 317–327, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.053>.

RATHEE, Vikramjit S. *et al.* Role of Associative Charging in the Entropy-Energy Balance of Polyelectrolyte Complexes. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 140, n. 45, p. 15319–15328, 2018.

REIS, Adriano V. *et al.* Mathematical model for the prediction of the overall profile of in vitro solute release from polymer networks. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 310, n. 1, p. 128–135, 2007.

REIS, Adriano V. *et al.* Reaction of glycidyl methacrylate at the hydroxyl and carboxylic groups of poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid): Is this reaction mechanism still unclear?. **Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], v. 74, n. 10, p. 3750–3757, 2009.

REN, Yingying *et al.* Boric acid as biocatalyst for living ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone. **Polymer**, [s. l.], v. 78, p. 51–58, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2015.09.063>.

SABATINI, Marco T.; BOULTON, Lee T.; SHEPPARD, Tom D. Borate esters: Simple catalysts for the sustainable synthesis of complex amides. **Science Advances**, [s. l.], v. 3, n. 9, p. 1–9, 2017.

SABER-SAMANDARI, Samaneh; YILMAZ, Osman; YILMAZ, Elvan. Photoinduced graft copolymerization onto chitosan under heterogeneous conditions. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, [s. l.], v. 49, n. 7, p. 591–598, 2012.

SÁNCHEZ-MORÁN, Héctor *et al.* Oxime Cross-Linked Alginate Hydrogels with Tunable Stress Relaxation. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 4419–4429, 2019.

SARMENTO, Bruno *et al.* Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 1–7, 2006.

SATHIYAVIMAL, Selvam *et al.* Eco-biocompatibility of chitosan coated biosynthesized copper oxide nanocomposite for enhanced industrial (Azo) dye removal from aqueous solution and antibacterial properties. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 241, n. August 2019, p. 116243, 2020.

SAYAH, Mohamed Yassine *et al.* Yield, esterification degree and molecular weight evaluation of pectins isolated from orange and grapefruit peels under different conditions. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 9, 2016.

SCHELLER, Philipp N. *et al.* Imine Reductase-Catalyzed Intermolecular Reductive Amination of Aldehydes and Ketones. **ChemCatChem**, [s. l.], v. 7, n. 20, p. 3239–3242, 2015.

SCHNELL, Carla N. *et al.* Films from xylan/chitosan complexes: preparation and characterization. **Cellulose**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 4393–4403, 2017.

SEEMAN, Jeffrey I. **Effect of Conformational Change on Reactivity in Organic Chemistry. Evaluations, Applications, and Extensions of Curtin-Hammett/Winstein-Holness Kinetics** *Chemical Reviews*. [S. l.: s. n.], 1983. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>. .

ŞEN, Ferhat *et al.* Antimicrobial agent-free hybrid cationic starch/sodium alginate polyelectrolyte films for food packaging materials. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 170, p. 264–270, 2017.

SMITH, Laura J. *et al.* Diels-Alder Click-Cross-Linked Hydrogels with Increased Reactivity Enable 3D Cell Encapsulation. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 926–935, 2018.

SONODA, Akinari *et al.* **Complex Formation between Boric Acid and Triethanolamine in Aqueous Solutions**. [S. l.: s. n.], 1998.

SPAGNOL, Cristiane *et al.* Superabsorbent hydrogel nanocomposites based on starch-g-poly(sodium acrylate) matrix filled with cellulose nanowhiskers. **Cellulose**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 1225–1237, 2012.

STEFANOVIĆ, Ivan S. *et al.* Structure, Thermal, and Morphological Properties of Novel Macroporous Amino-Functionalized Glycidyl Methacrylate Based Copolymers. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 54, n. 27, p. 6902–6911, 2015a.

STEFANOVIĆ, Ivan S. *et al.* Structure, Thermal, and Morphological Properties of Novel Macroporous Amino-Functionalized Glycidyl Methacrylate Based Copolymers. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 54, n. 27, p. 6902–6911, 2015b.

SUN HAN CHANG, Raul *et al.* Rheological Analysis of the Gelation Kinetics of an Enzyme Cross-linked PEG Hydrogel. research-article. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 2198–2206, 2019a.

SUN HAN CHANG, Raul *et al.* Rheological Analysis of the Gelation Kinetics of an Enzyme Cross-linked PEG Hydrogel. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 2198–2206, 2019b.

SUN, Yuling; HUANG, Yanbin. Disulfide-crosslinked albumin hydrogels. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 4, n. 16, p. 2768–2775, 2016a.

SUN, Yuling; HUANG, Yanbin. Disulfide-crosslinked albumin hydrogels. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 4, n. 16, p. 2768–2775, 2016b.

TAHA, Mutasem O. *et al.* Sodium lauryl sulfate impedes drug release from zinc-crosslinked alginate beads: Switching from enteric coating release into biphasic profiles. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 350, n. 1–2, p. 291–300, 2008.

TAN, Songwen; EBRAHIMI, Amirali; LANGRISH, Timothy. Smart release-control of microencapsulated ingredients from milk protein tablets using spray drying and heating. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 92, p. 181–188, 2019.

TENÓRIO-NETO, Ernandes Taveira *et al.* Synthesis and drug release profile of a dual-responsive poly(ethylene glycol) hydrogel nanocomposite. **RSC Advances**, [s. l.], v. 7, n. 44, p. 27637–27644, 2017.

THAKUR, Neha *et al.* Biocompatible Fe³⁺ and Ca²⁺ Dual Cross-Linked G-Quadruplex Hydrogels as Effective Drug Delivery System for pH-Responsive Sustained Zero-Order Release of Doxorubicin. **ACS Applied Bio Materials**, [s. l.], v. 2, n. 8, p. 3300–3311, 2019.

TODOROVIC, Mihajlo; PERRIN, David M. Recent developments in catalytic amide bond formation. **Peptide Science**, [s. l.], v. 112, n. 6, 2020.

UMAN, Selen; DHAND, Abhishek; BURDICK, Jason A. Recent advances in shear-thinning and self-healing hydrogels for biomedical applications. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 137, n. 25, p. 1–20, 2020a.

UMAN, Selen; DHAND, Abhishek; BURDICK, Jason A. **Recent advances in shear-thinning and self-healing hydrogels for biomedical applications**. [S. l.]: John Wiley and Sons Inc., 2020b.

VACHOUD, L. *et al.* Preparation and characterization of chitin hydrogels by water vapor induced gelation route. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 431–439, 2012.

VAN DE LOOSDRECHT, A A *et al.* A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia **Journal of Immunological Methods**. [S. l.: s. n.], 1994.

VOLOKHOVA, Anastasia S.; EDGAR, Kevin J.; MATSON, John B. **Polysaccharide-containing block copolymers: Synthesis and applications**. [S. l.]: Royal Society of Chemistry, 2020.

WALL, Stephanie B. *et al.* Oxidative modification of proteins: An emerging mechanism of cell signaling. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 3 SEP, 2012.

WANG, Yiming *et al.* Chitosan cross-linked poly(acrylic acid) hydrogels: Drug release control and mechanism. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 152, p. 252–259, 2017.

WANG, Juan *et al.* In Situ-Forming Polyamidoamine Dendrimer Hydrogels with Tunable Properties Prepared via Aza-Michael Addition Reaction. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 10494–10503, 2017.

WANG, Chunping *et al.* Ultraviolet light enhanced sodium persulfate oxidation of cellulose to facilitate the preparation of cellulose nanofibers. **Cellulose**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 2041–2051, 2020.

WILLIAMS, David F. Biocompatibility pathways and mechanisms for bioactive materials: The bioactivity zone. **Bioactive Materials**, [s. l.], v. 10, p. 306–322, 2022.

WILLIAMS, David F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, [s. l.], v. 30, n. 30, p. 5897–5909, 2009.

WILLIAMS, David F. There is no such thing as a biocompatible material. **Biomaterials**, [s. l.], v. 35, n. 38, p. 10009–10014, 2014.

WORCH, Joshua C. *et al.* **Click Nucleophilic Conjugate Additions to Activated Alkynes: Exploring Thiol-yne, Amino-yne, and Hydroxyl-yne Reactions from (Bio)Organic to Polymer Chemistry**. [S. l.]: American Chemical Society, 2021.

WU, Xiaojun *et al.* Fully physically crosslinked pectin-based hydrogel with high stretchability and toughness for biomedical application. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 149, p. 707–716, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.297>.

WU, Li Xia *et al.* Quaternized curdlan/pectin polyelectrolyte complexes as biocompatible nanovehicles for curcumin. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 291, n. April, p. 180–186, 2019.

WU, Dongmei *et al.* Structure-activity relationship of Citrus segment membrane RG-I pectin against Galectin-3: The galactan is not the only important factor. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 245, 2020.

WU, De Qun *et al.* Synthesis and characterization of arginine-NIPAAm hybrid hydrogel as wound dressing: In vitro and in vivo study. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 65, p. 305–316, 2018.

XIONG, Chengdong *et al.* Hierarchically tunable structure of polystyrene-based microfiber membranes for separation and selective adsorption of oil-water. **Applied Surface Science**, [s. l.], v. 532, n. July, p. 147400, 2020.

XU, Jianyu *et al.* The role of chemical and physical crosslinking in different deformation stages of hybrid hydrogels. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 100, n. November 2017, p. 86–95, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.01.020>.

YAN, Tingsheng *et al.* Carboxymethyl chitosan based redox-responsive micelle for near-infrared fluorescence image-guided photo-chemotherapy of liver cancer. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 253, 2021.

YANG, Gang *et al.* Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2018.

YE, Bihua *et al.* A facile method to prepare polysaccharide-based in-situ formable hydrogels with antibacterial ability. **Materials Letters**, [s. l.], v. 183, p. 81–84, 2016.

YE, Jing *et al.* Advances in hydrogels based on dynamic covalent bonding and prospects for its biomedical application. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 139, n. September, p. 110024, 2020.

YIN, Huishuang *et al.* Smart pH-Sensitive Hydrogel Based on the Pineapple Peel-Oxidized Hydroxyethyl Cellulose and the Hericium erinaceus Residue Carboxymethyl Chitosan for Use in Drug Delivery. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 253–264, 2022a.

YIN, Huishuang *et al.* Smart pH-Sensitive Hydrogel Based on the Pineapple Peel-Oxidized Hydroxyethyl Cellulose and the Hericium erinaceus Residue Carboxymethyl Chitosan for Use in Drug Delivery. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 253–264, 2022b.

ZHANG, Shuang *et al.* Cellulose Nanocrystal Reinforced Collagen-Based Nanocomposite Hydrogel with Self-Healing and Stress-Relaxation Properties for Cell Delivery. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 2400–2408, 2020.

ZHANG, Junmei *et al.* Facile fabrication of tough photocrosslinked polyvinyl alcohol hydrogels with cellulose nanofibrils reinforcement. **Polymer**, [s. l.], v. 173, n. February, p. 103–109, 2019.

ZHANG, Xin *et al.* Modulating degradation of sodium alginate/bioglass hydrogel for improving tissue infiltration and promoting wound healing. **Bioactive Materials**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. 3692–3704, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.03.038>.

ZHANG, Junmei Zhi Junji *et al.* Polyelectrolyte complexation via viscoelastic phase separation results in tough and self-recovering porous hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 660–668, 2019.

ZHANG, Mengdi *et al.* Real-time and noninvasive tracking of injectable hydrogel degradation using functionalized AIE nanoparticles. **Nanophotonics**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 2063–2075, 2020.

ZHOU, Yang *et al.* Oxidized hydroxypropyl cellulose/carboxymethyl chitosan hydrogels permit pH-responsive, targeted drug release. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 300, n. October 2022, p. 120213, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120213>.

ZHU, Tianxue *et al.* Recent Progress of Polysaccharide-Based Hydrogel Interfaces for Wound Healing and Tissue Engineering. **Advanced Materials Interfaces**, [s. l.], v. 6, n. 17, p. 1–22, 2019.

ZOTT, Fabian L.; KOROTENKO, Vasily; ZIPSE, Hendrik. The pH-Dependence of the Hydration of 5-Formylcytosine: an Experimental and Theoretical Study. **ChemBioChem**, [s. l.], v. 23, n. 7, 2022.

Apêndices

Apêndice A – Informações complementares do Capítulo 3

Tabela A.1. Principais sinais de ressonância observados nos espectros de RMN de ^1H da QT, PVA-MA e do hidrogel QT/PVA-MA e suas respectivas atribuições.

Amostra	Deslocamento químico (ppm)	Atribuição
QT	3,90–3,60	H(3)–H(6) (GlcN)
	3,08	H(2) (GlcN)
PVA-MA	6,17; 5,74	H vinílico ($\text{C}=\text{CH}_2$, GMA)
	4,03	H metilídino (CH , PVA)
	3,80–3,54	H metilênico (CH_2 , GMA)
	1,93	H metílico (CH_3 , GMA)
	1,60	H metilênico (CH_2 , PVA)
QT/PVA-MA	4,12	H metilídino (CH , PVA)
	3,90–3,41	H metilênico (CH_2 , GMA) + H(3)– H(6) (GlcN)
	3,26	H(2) (GlcN)
	1,64	H metílico (CH_3 , GMA) + H metilênico (CH_2 , PVA)

Tabela A.2. Principais sinais de ressonância observados nos espectros de RMN de ^{12}C da QT, PVA-MA e do hidrogel QT/PVA-MA e suas respectivas atribuições.

Amostra	Deslocamento químico (ppm)	Atribuição
QT	98	C(1) (GlcN)
	77–56	C(2)–C(6) (GlcN)
PVA-MA	168	C=O (GMA)
	138; 130	C vinílico (GMA)
	68	CH (PVA)
	44	CH_2 (PVA)
	75–65	CH, CH_2 (GMA)
QT/PVA-MA	170	C=O (GMA)
	105	C(1) (GlcN)
	83–58	C(2)–C(6) (GlcN) + CH, CH_2 (PVA)
		+ CH, CH_2 (GMA)

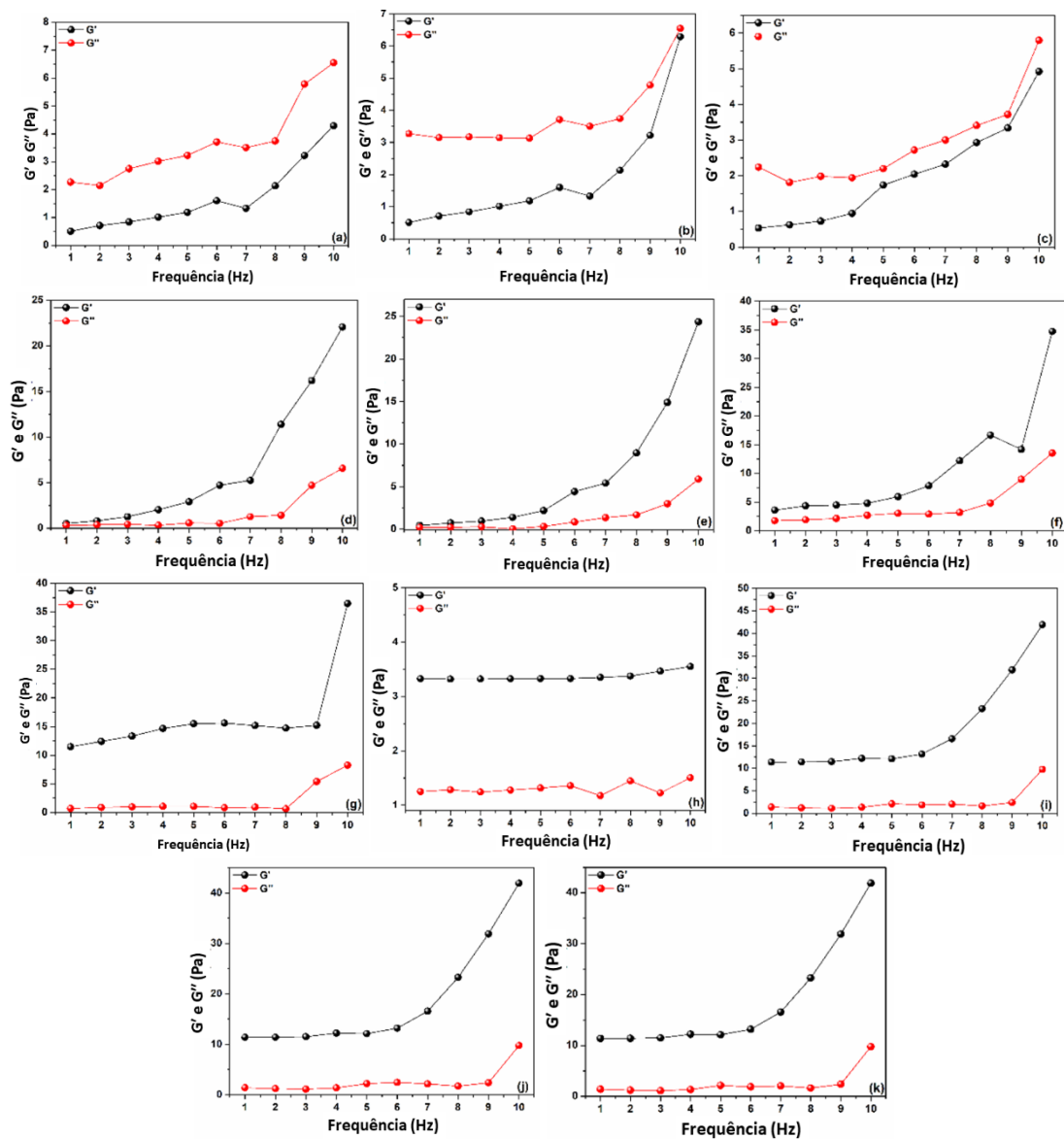


Figura A.1. Curvas dos módulos G' e G'' do meio preparado nas condições experimentais descritas na entrada 3 da Tabela 1 no começo da reação (a) e após 6h (b), 12h (c), 18h (d), 24h (e), 36h (f), 60h (g), 72h (h), 84h (i), 96h (j) e 110h (k).

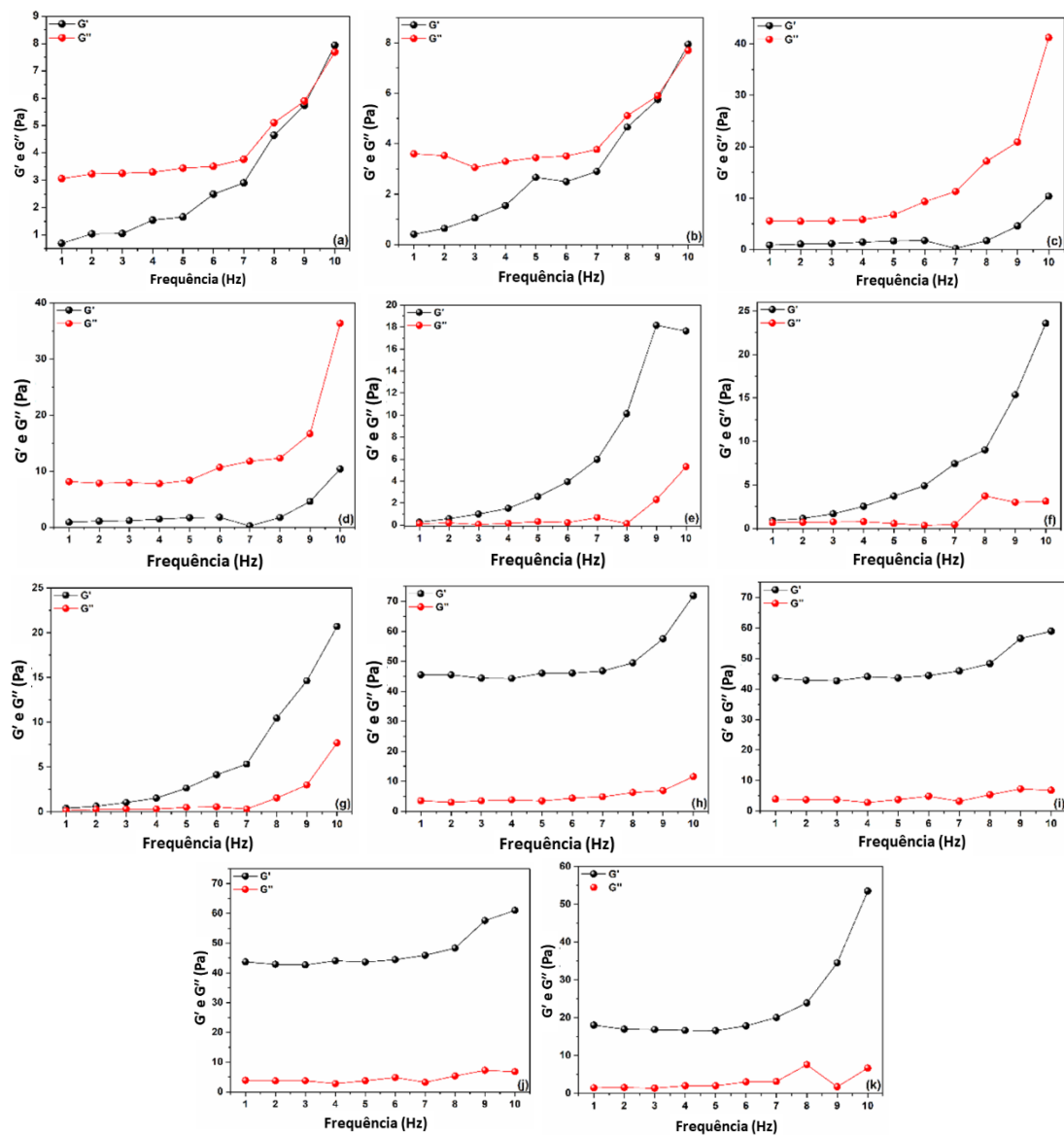


Figura A.2. Curvas dos módulos G' e G'' do meio preparado nas condições experimentais descritas na entrada 4 da Tabela 1 no começo da reação (a) e após 6h (b), 12h (c), 18h (d), 24h (e), 36h (f), 60h (g), 72h (h), 84h (i), 96h (j) e 110h (k).

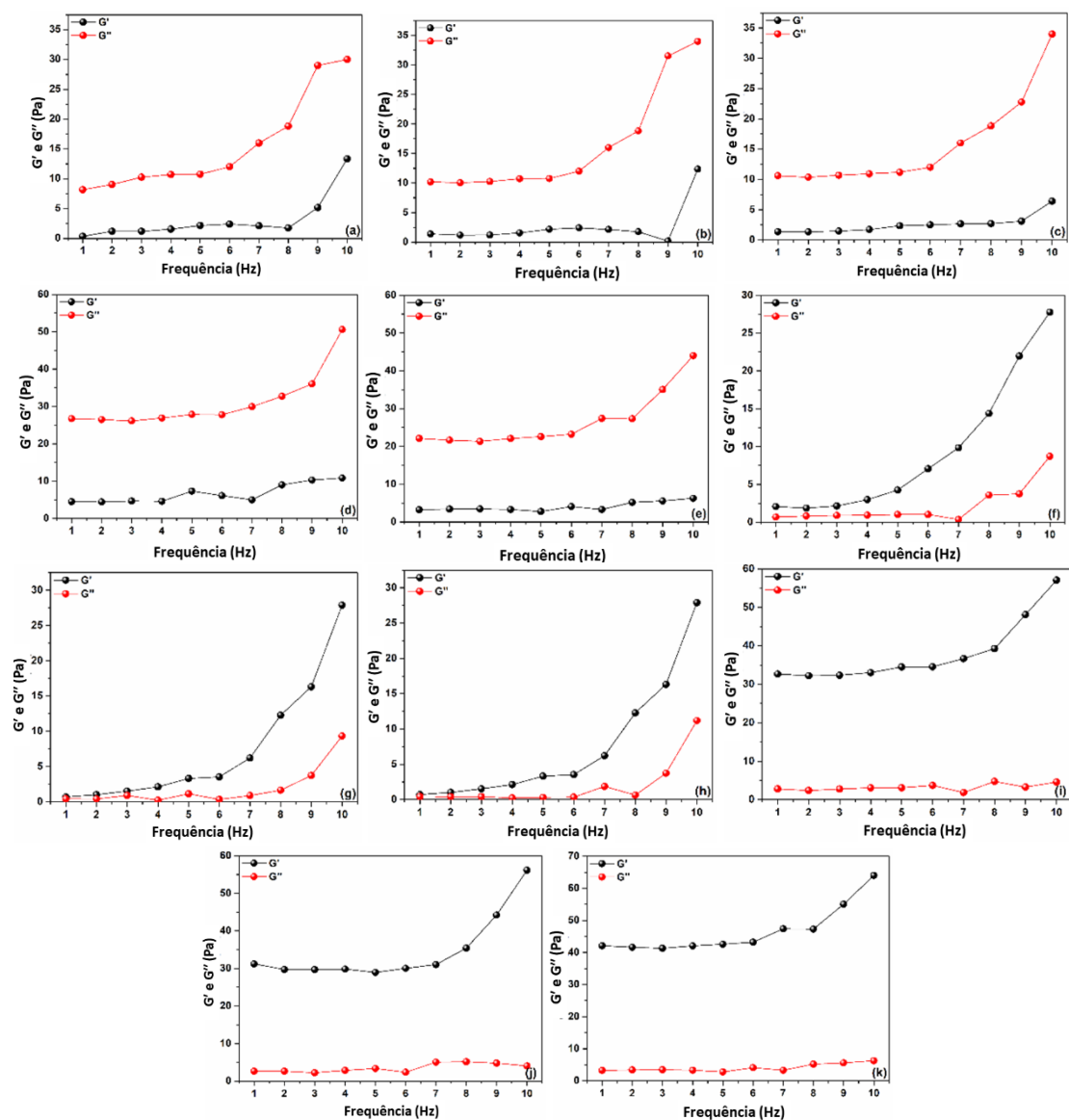


Figura A.3. Curvas dos módulos G' e G'' do meio preparado nas condições experimentais descritas na entrada 5 da Tabela 1 no começo da reação (a) e após 6h (b), 12h (c), 18h (d), 24h (e), 36h (f), 60h (g), 72h (h), 84h (i), 96h (j) e 110h (k).

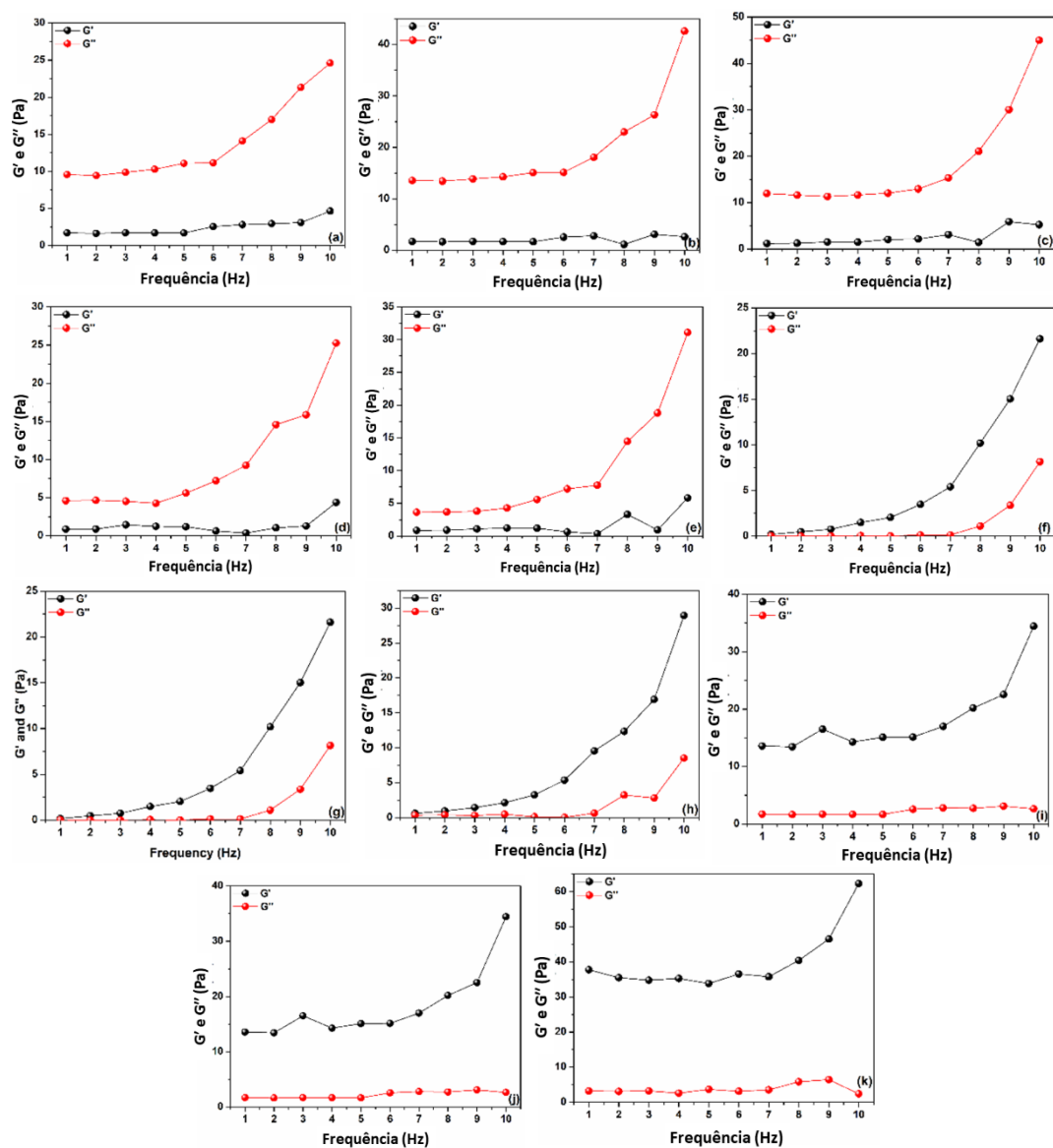


Figura A.4. Curvas dos módulos G' e G'' do meio preparado nas condições experimentais descritas na entrada 7 da Tabela 1 no começo da reação (a) e após 6h (b), 12h (c), 18h (d), 24h (e), 36h (f), 60h (g), 72h (h), 84h (i), 96h (j) e 110h (k).

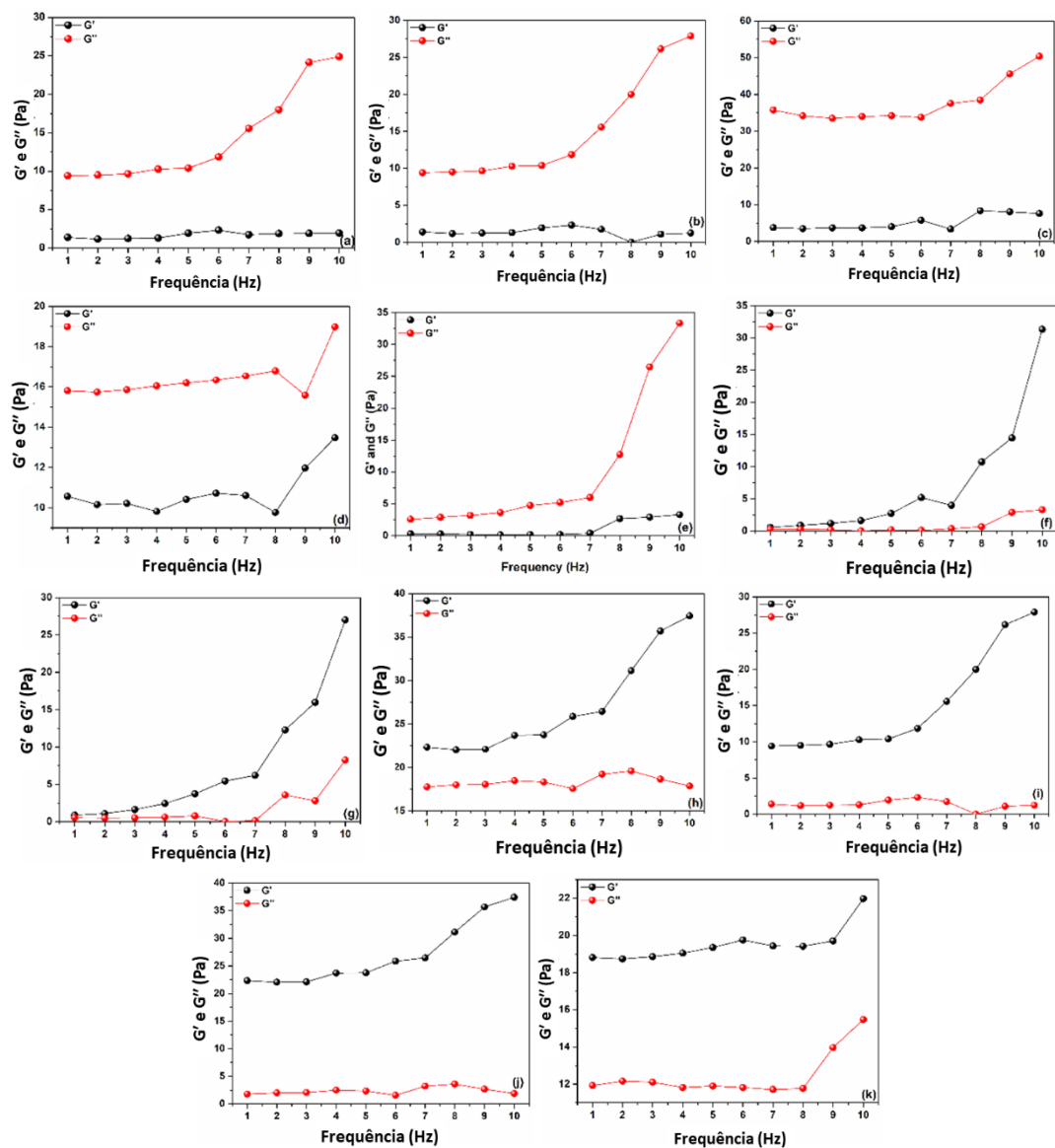


Figura A.5. Curvas dos módulos G' e G'' do meio preparado nas condições experimentais descritas na entrada 8 da Tabela 1 no começo da reação (a) e após 6h (b), 12h (c), 18h (d), 24h (e), 36h (f), 60h (g), 72h (h), 84h (i), 96h (j) e 110h (k).

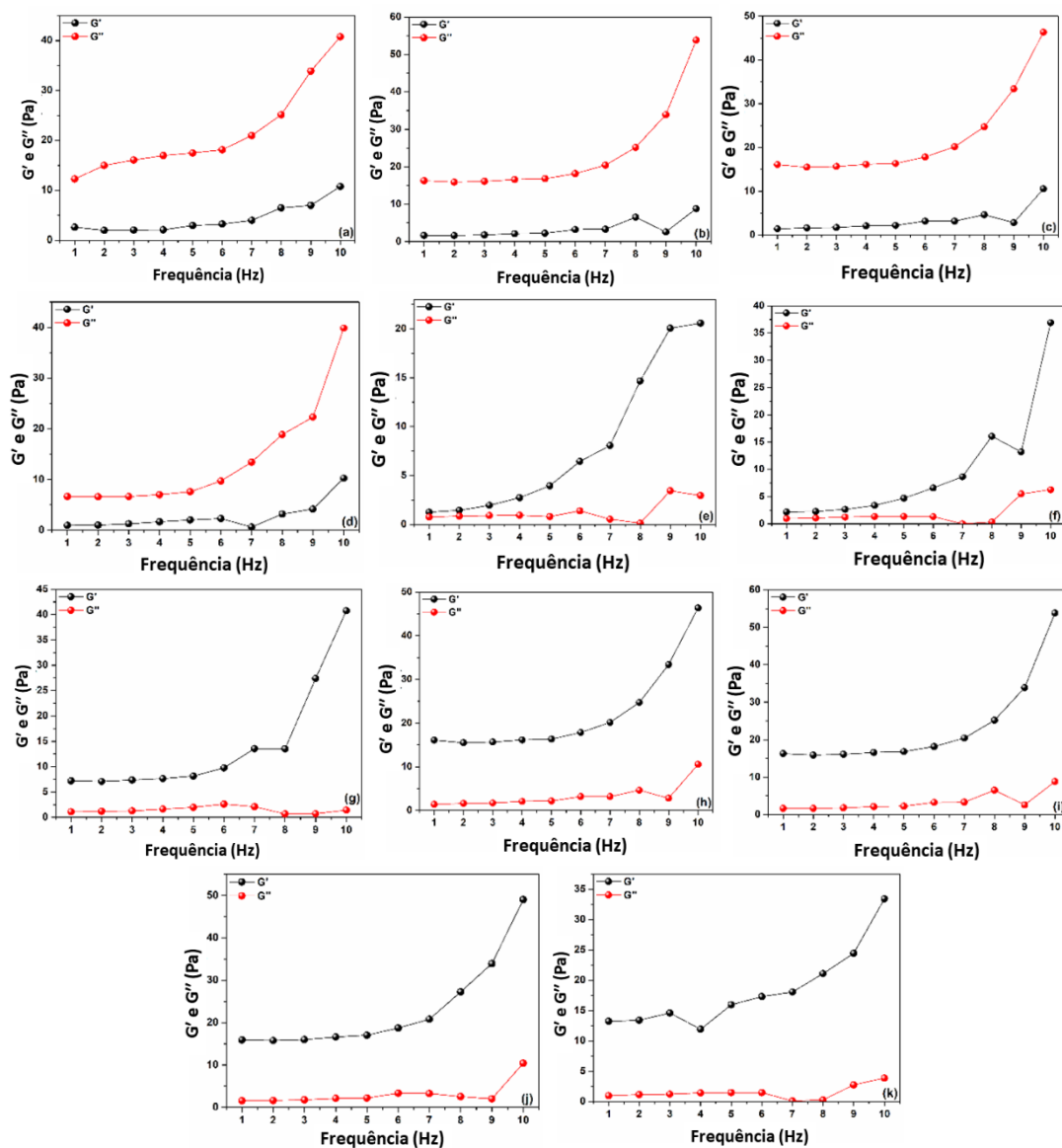


Figura A.6. Curvas dos módulos G' e G'' do meio preparado nas condições experimentais descritas na entrada 9 da Tabela 1 no começo da reação (a) e após 6h (b), 12h (c), 18h (d), 24h (e), 36h (f), 60h (g), 72h (h), 84h (i), 96h (j) e 110h (k).

Tabela A.3. Comparação das propriedades mecânicas do hidrogel QT/PVA-MA com outros materiais aplicados como curativo ou substrato para cultivo celular.

Hidrogel	Aplicação	Propriedades mecânicas			Referência
		Módulo de Young	Força de ruptura	Deformação até ruptura	
QT/PVA-MA	Curativo; substrato	4,40 Pa	2,94 N	52,00%	Esse trabalho
QT/sulfato de condroitina	Curativo	10 Pa	5,00 N	41,00%	FAJARDO <i>et al.</i> , 2010
QT/Poli(ácido acrílico)	Curativo	–	23,00 N	50,00%	HE <i>et al.</i> , 2020
Celulose/Colágeno	Substrato	15 Pa	32,00 N	40,00%	MOKHTARI <i>et al.</i> , 2020
QT/celulose	Substrato	30 Pa	40,00 N	30,00%	MATINFAR <i>et al.</i> , 2020

Apêndice B – Informações complementares do Capítulo 4

Tabela B.1. Principais bandas observadas no espectro de FTIR da Pct e Pct-SH e suas atribuições.

Amostra	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
Pct	3465	Estiramento O–H dos grupos OH
	2988–2896	Estiramento C–H
	1643	Estiramento C=O assimétrico dos grupos COOH
	1413	Estiramento C=O simétrico dos grupos COOH
	1196–971	Estiramento C–O
Pct-SH	3435	Estiramento O–H dos grupos OH
	3023–2836	Estiramento C–H
	2710	Estiramento S–H dos grupos SH
	1721	Estiramento C=O dos grupos COO ⁻
	1687	Estiramento C=O dos grupos COOH da Cyst
	1557	Estiramento C=O da ligação C(O)NH
	1198–981	Estiramento C–O

Tabela B.2. Principais sinais de ressonância observados nos espectros de RMN de ¹H da Pct e Pct-SH e suas respectivas atribuições.

Amostra	Deslocamento químico (ppm)	Atribuição
Pct	5,09	H(1) (GalA)
	4,43–3,63	H(2)–H(4) (GalA)
Pct-SH	5,11	H(1) (GalA)
	4,54–3,53	H(2)–H(4) (GalA)
	3,29	H _a da Cyst
	2,90	H _b da Cyst

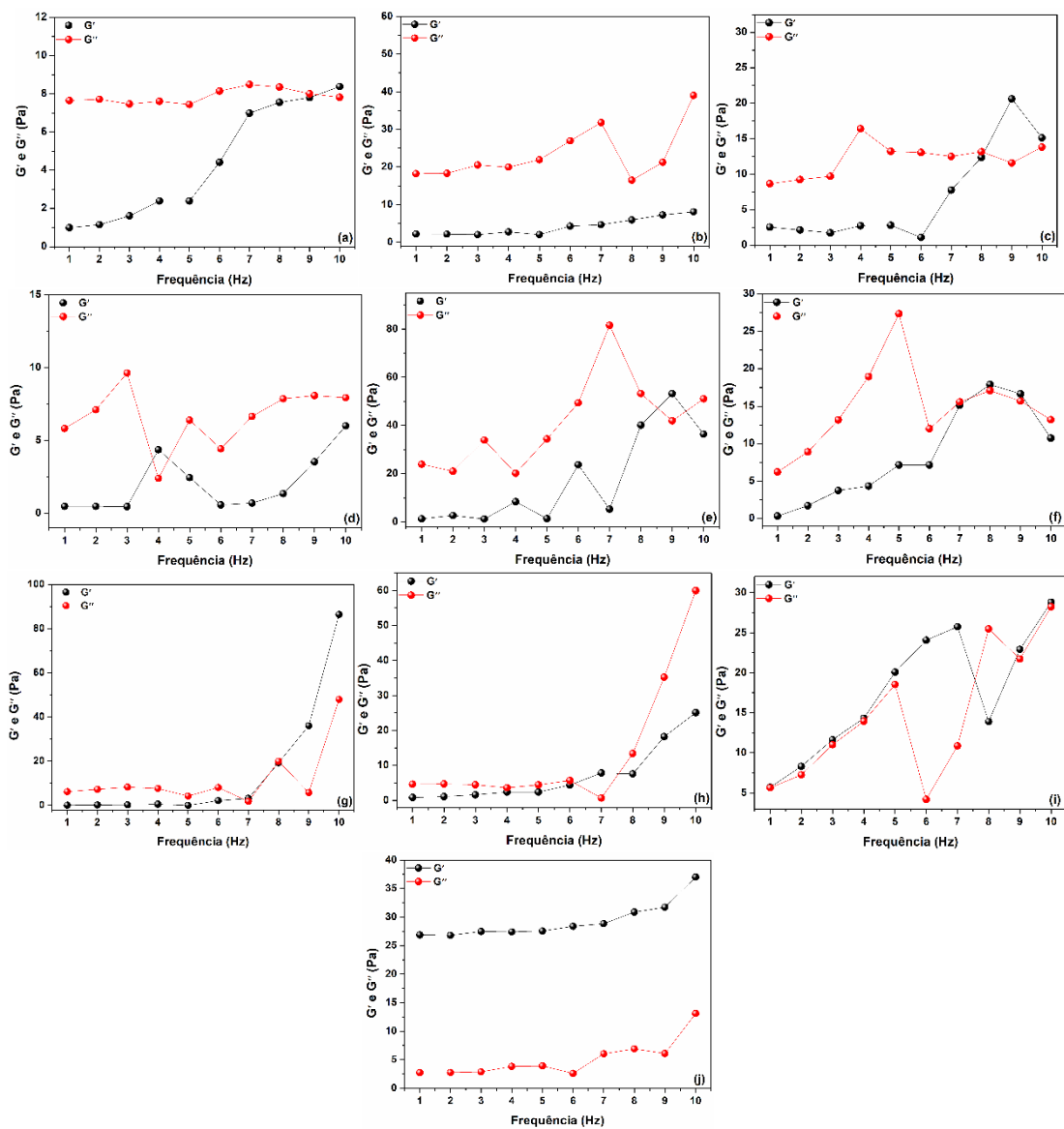


Figura B.1. Curvas dos módulos G' e G'' do meio de gelificação do hidrogel Pct-SH₍₅₋₁₎ no começo da reação (a) e após 5 min (b), 10 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 90 min (f), 180 min (g), 300 min (h), 360 min (i) e 720 min (j).

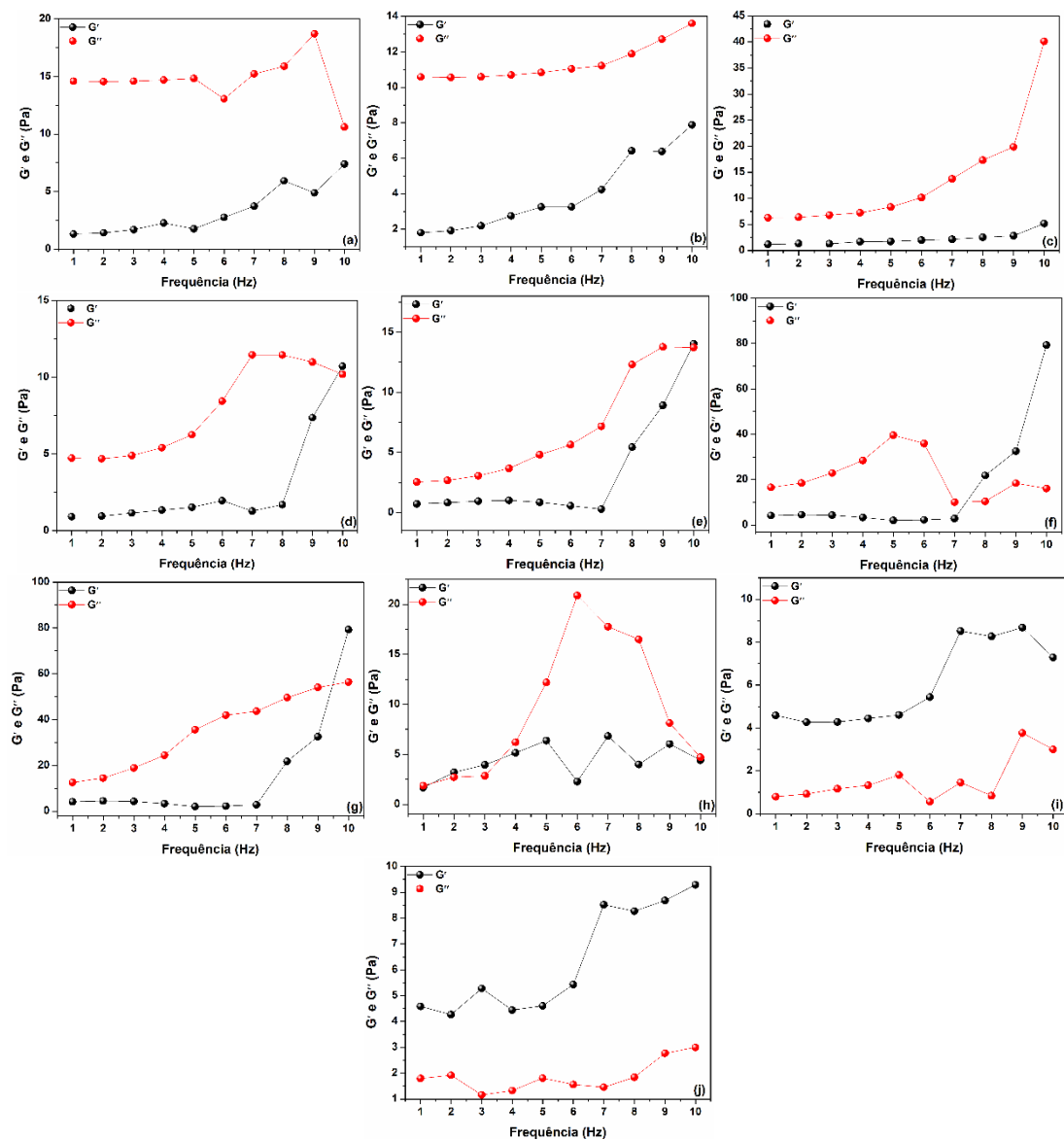


Figura B.2. Curvas dos módulos G' e G'' do meio de gelificação do hidrogel Pct-SH₍₅₋₂₎ no começo da reação (a) e após 5 min (b), 10 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 90 min (f), 180 min (g), 300 min (h), 360 min (i) e 720 min (j).

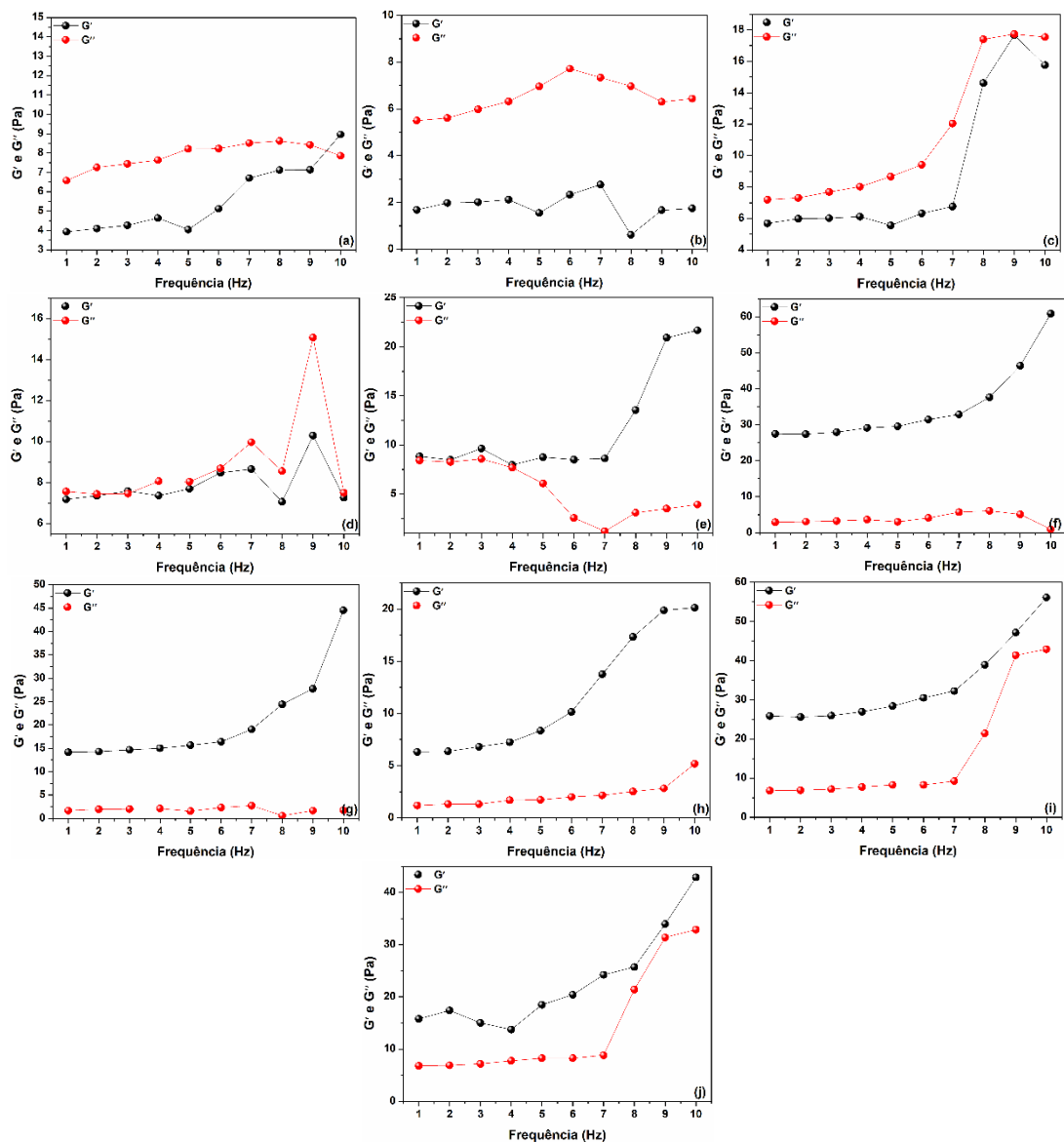


Figura B.3. Curvas dos módulos G' e G'' do meio de gelificação do hidrogel Pct-SH₍₅₋₃₎ no começo da reação (a) e após 5 min (b), 10 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 90 min (f), 180 min (g), 300 min (h), 360 min (i) e 720 min (j).

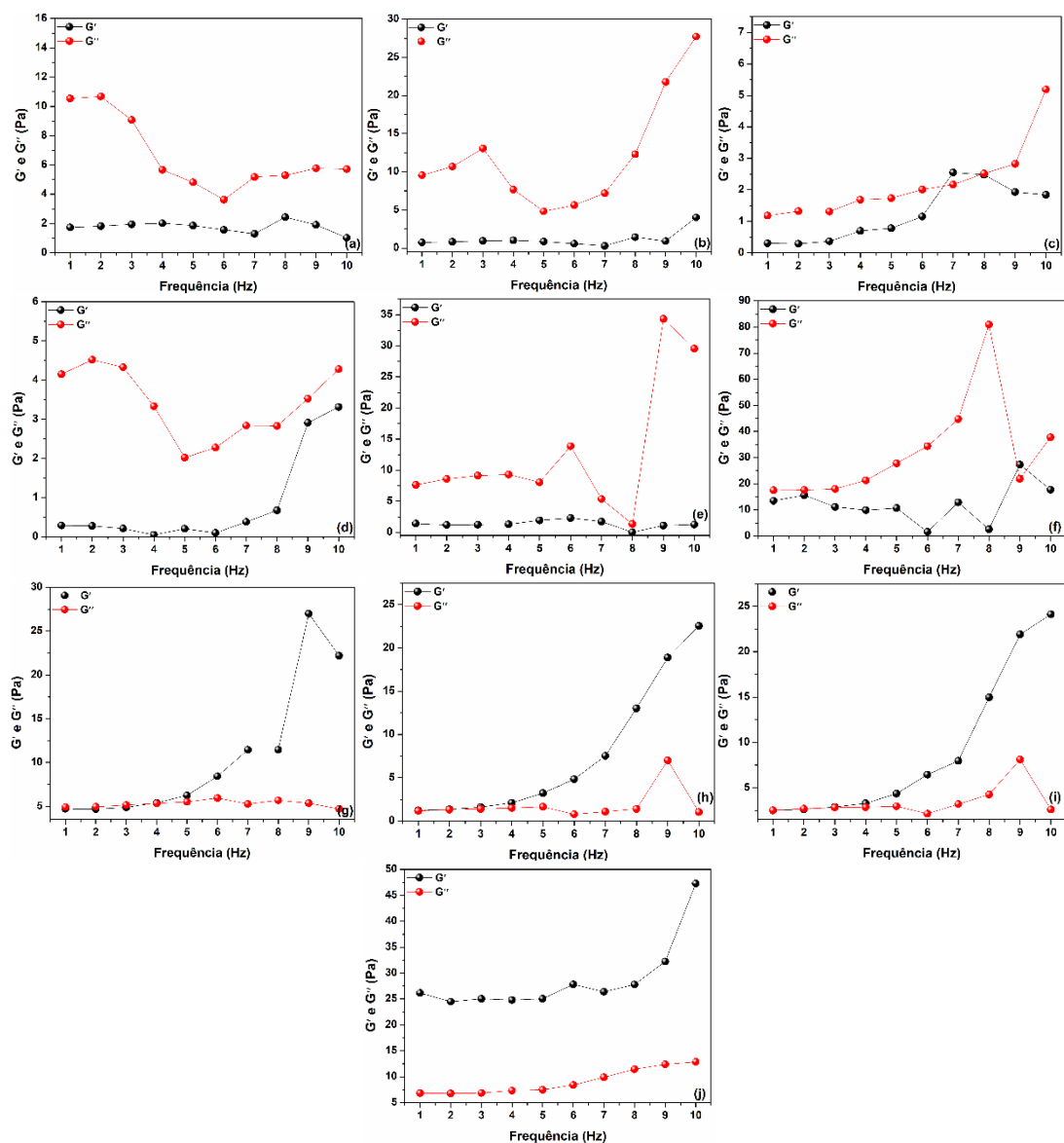


Figura B.4. Curvas dos módulos G' e G'' do meio de gelificação do hidrogel Pct-SH₍₁₀₋₁₎ no começo da reação (a) e após 5 min (b), 10 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 90 min (f), 180 min (g), 300 min (h), 360 min (i) e 720 min (j).

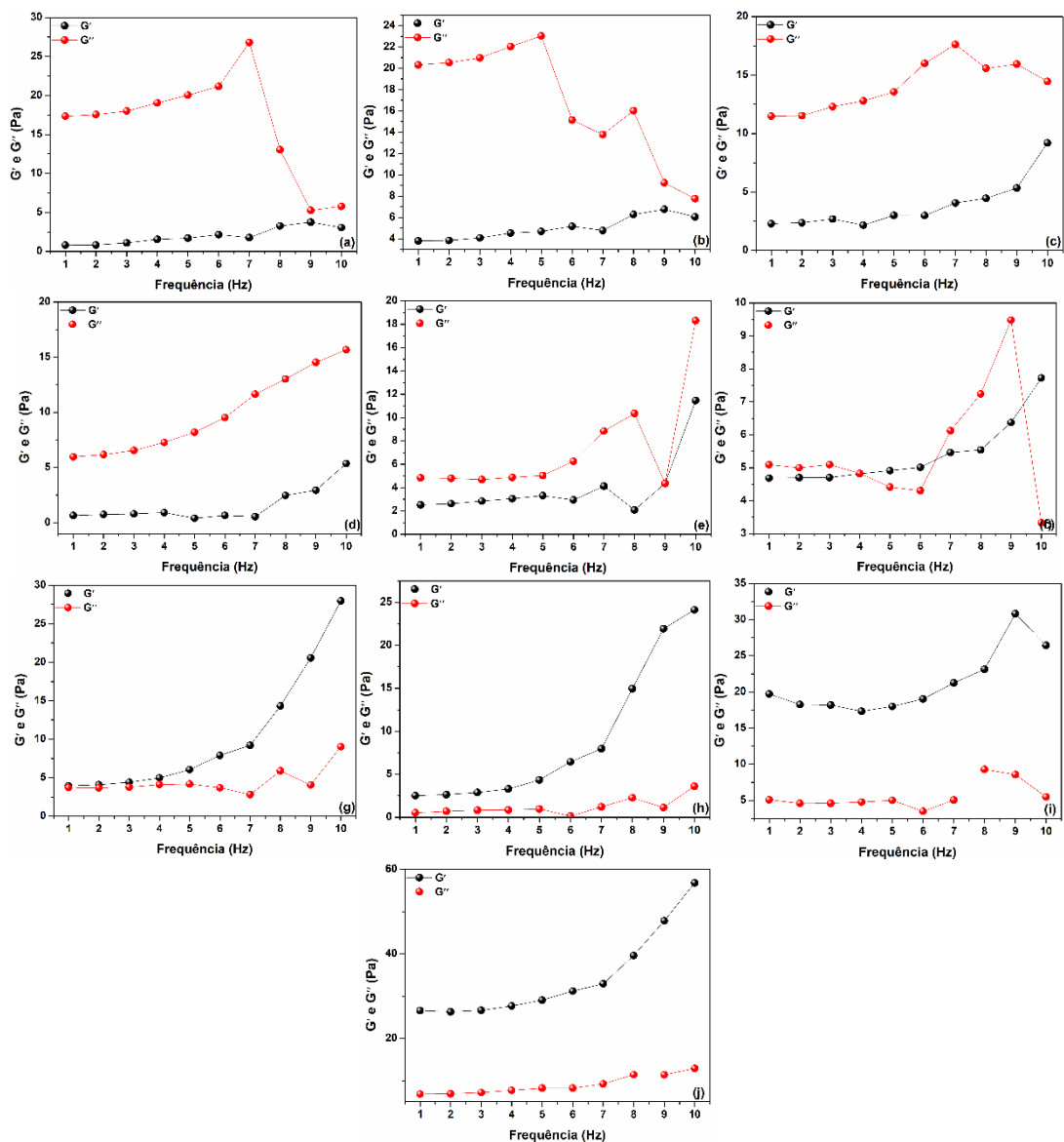


Figura B.5. Curvas dos módulos G' e G'' do meio de gelificação do hidrogel Pct-SH₍₁₀₋₂₎ no começo da reação (a) e após 5 min (b), 10 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 90 min (f), 180 min (g), 300 min (h), 360 min (i) e 720 min (j).

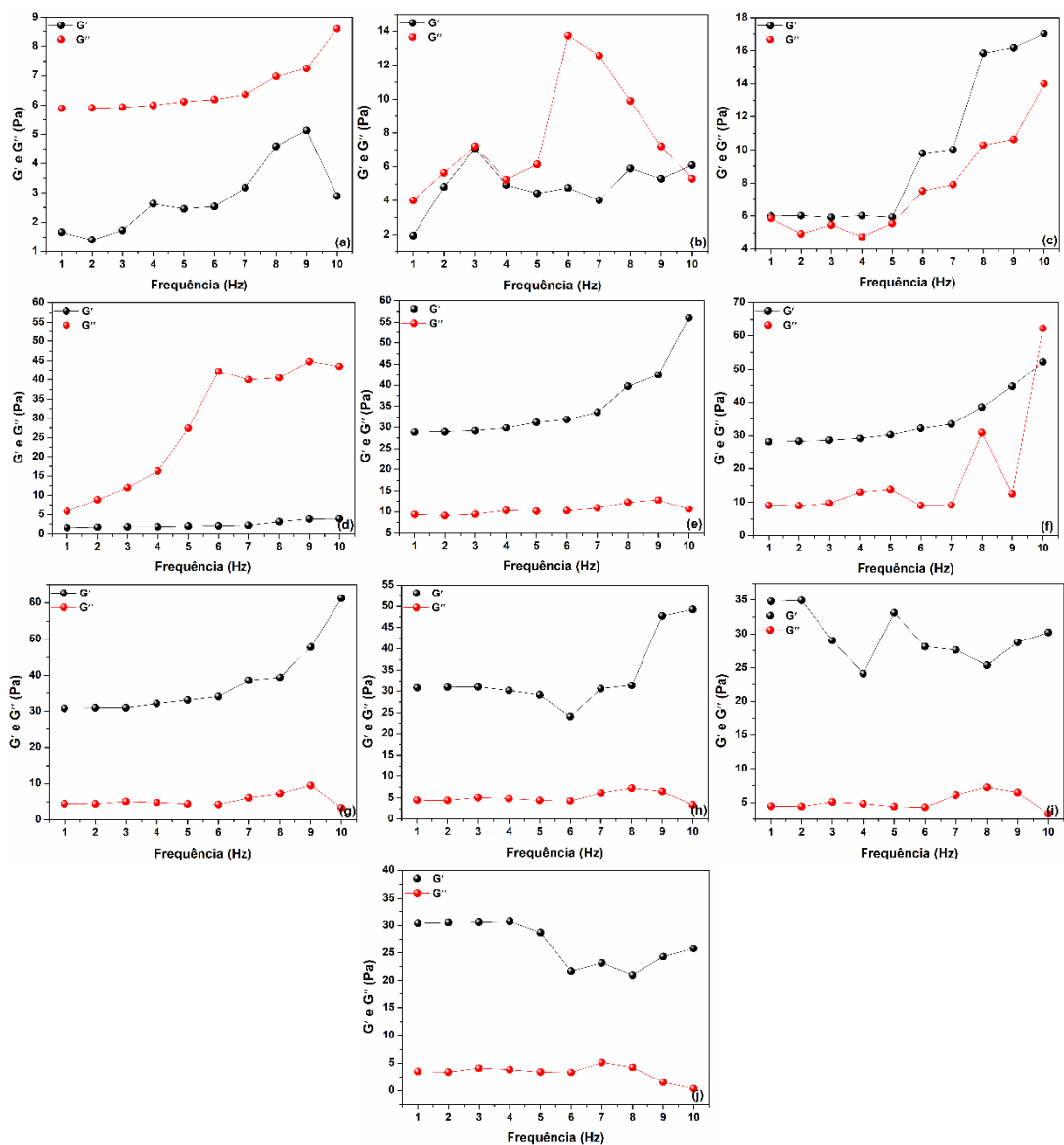


Figura B.6. Curvas dos módulos G' e G'' do meio de gelificação do hidrogel Pct-SH₍₁₀₋₃₎ no começo da reação (a) e após 5 min (b), 10 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 90 min (f), 180 min (g), 300 min (h), 360 min (i) e 720 min (j).

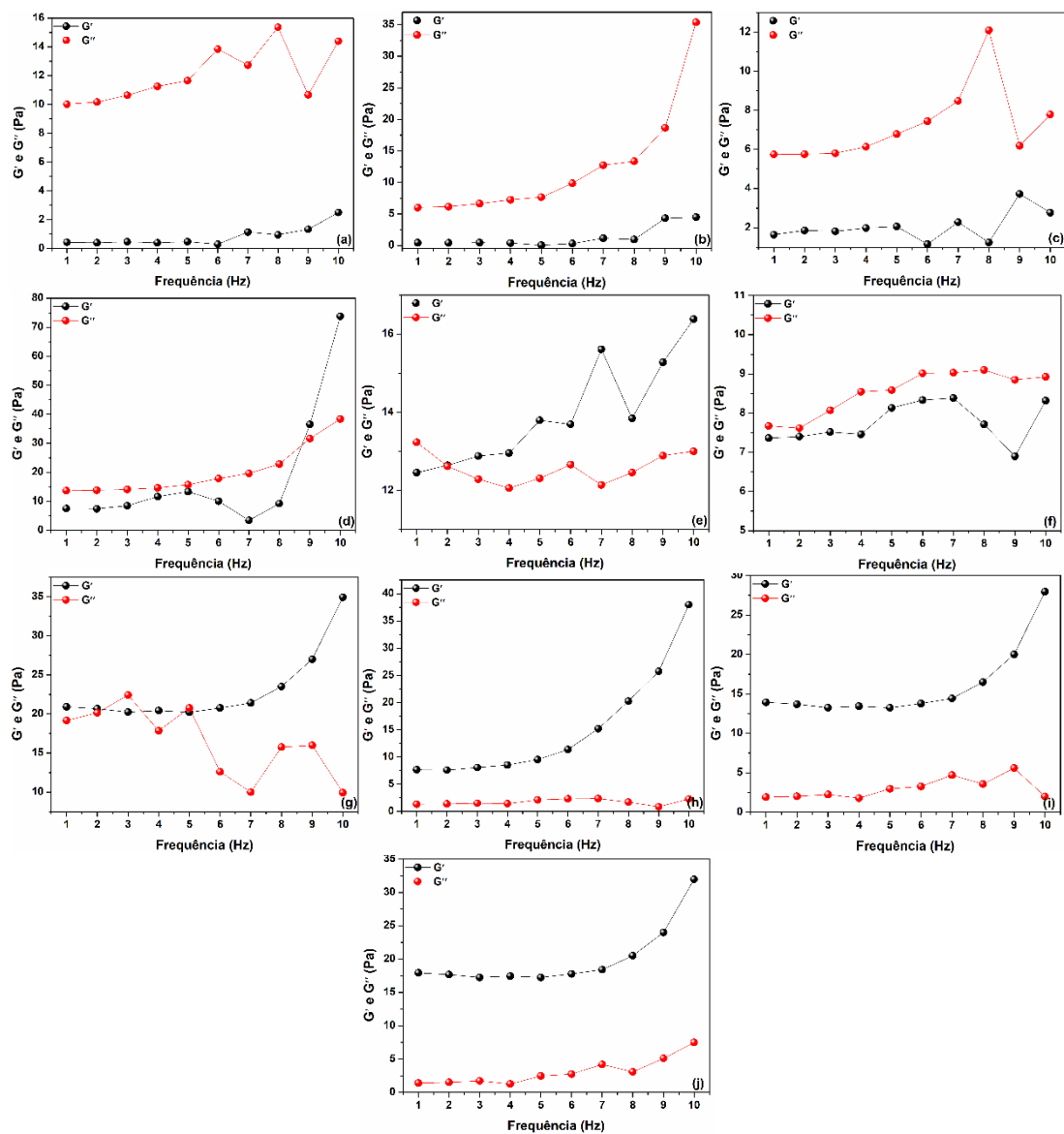


Figura B.7. Curvas dos módulos G' e G'' do meio de gelificação do hidrogel Pct-SH₍₁₅₋₁₎ no começo da reação (a) e após 5 min (b), 10 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 90 min (f), 180 min (g), 300 min (h), 360 min (i) e 720 min (j).

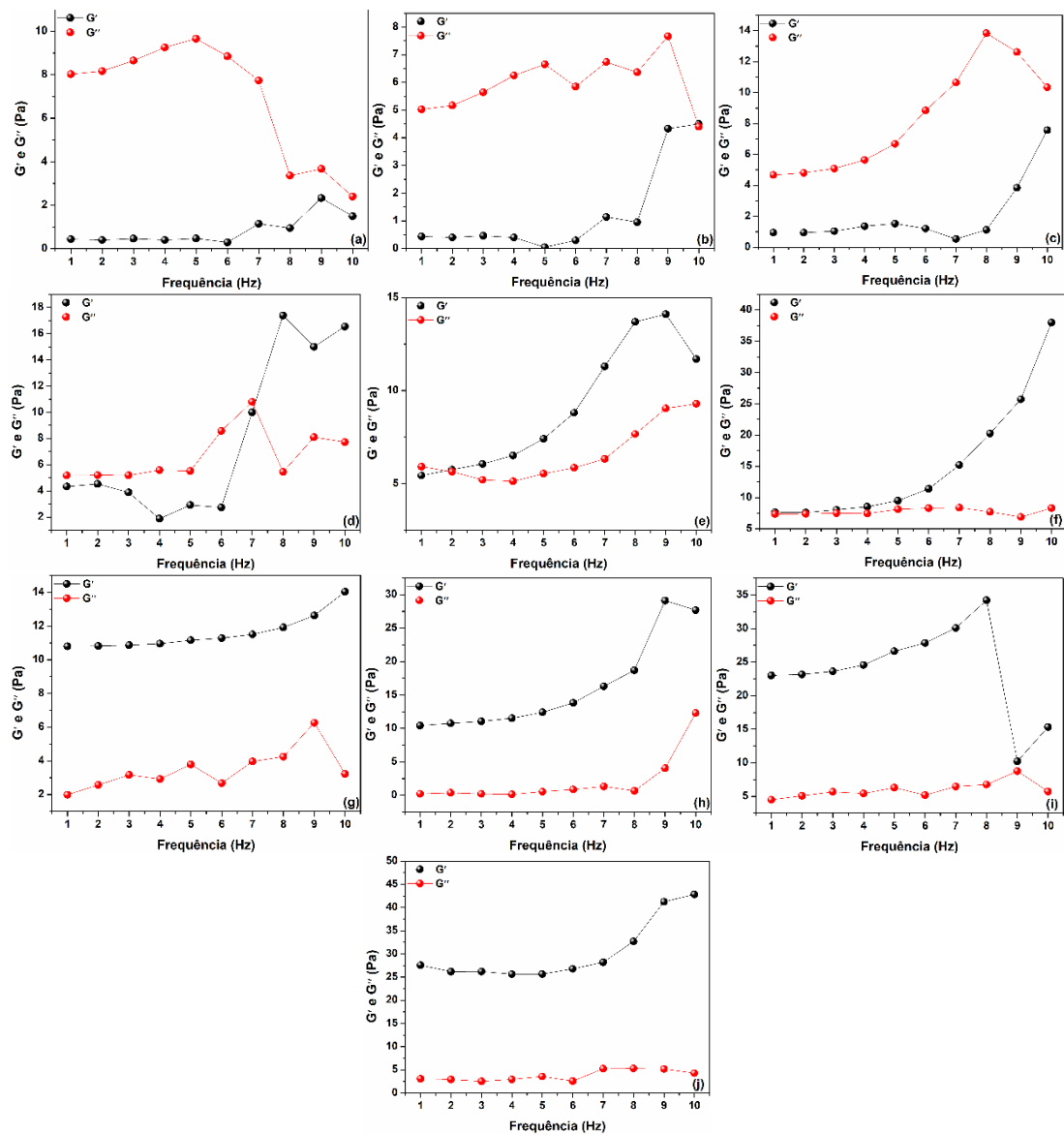


Figura B.8. Curvas dos módulos G' e G'' do meio de gelificação do hidrogel Pct-SH₍₁₅₋₂₎ no começo da reação (a) e após 5 min (b), 10 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 90 min (f), 180 min (g), 300 min (h), 360 min (i) e 720 min (j).

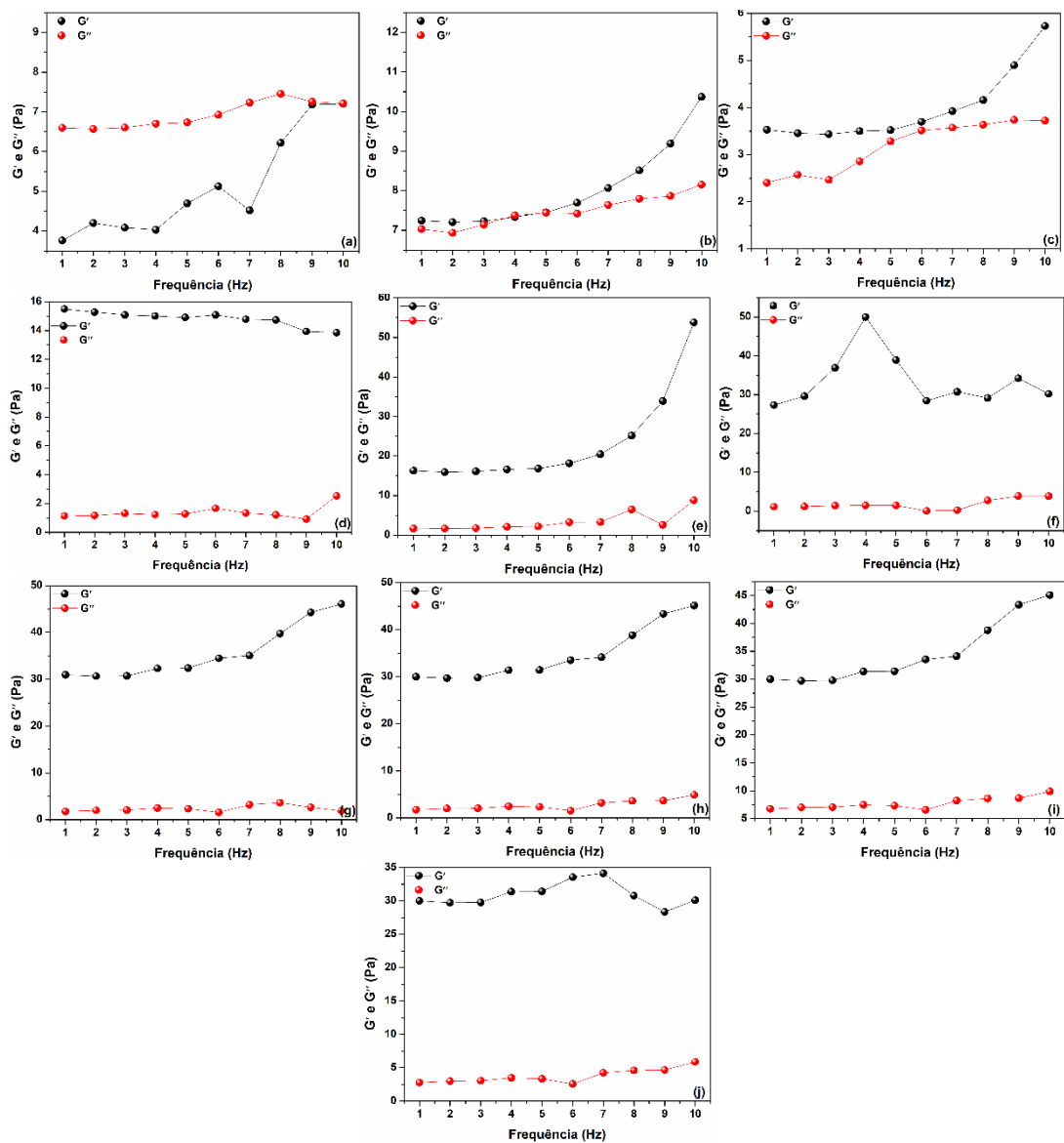


Figura B.9. Curvas dos módulos G' e G'' do meio de gelificação do hidrogel Pct-SH₍₁₅₋₃₎ no começo da reação (a) e após 5 min (b), 10 min (c), 30 min (d), 60 min (e), 90 min (f), 180 min (g), 300 min (h), 360 min (i) e 720 min (j).

Apêndice C – Informações complementares do Capítulo 5

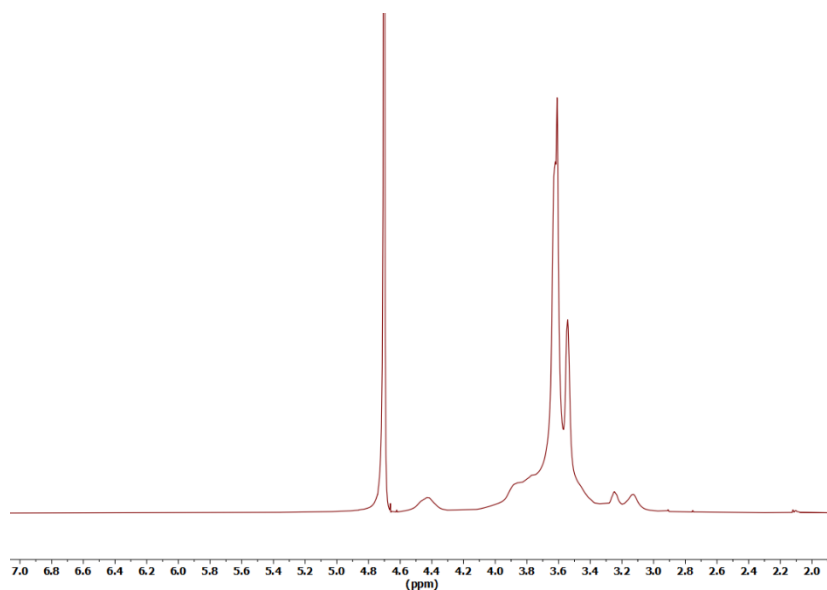


Figura C.1. Espectro de RMN de ^1H do HEC-Acetal sintetizado nas condições experimentais da entrada 1 da Tabela 9.

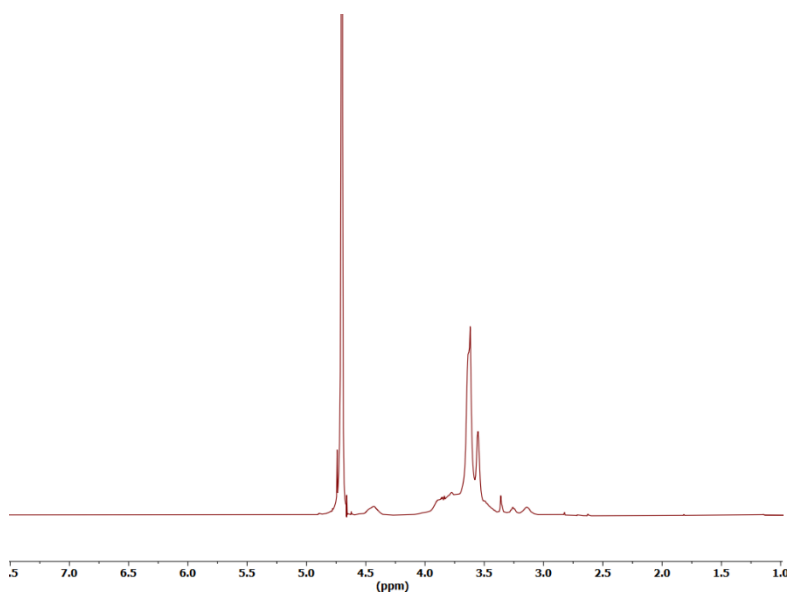


Figura C.2. Espectro de RMN de ^1H do HEC-Acetal sintetizado nas condições experimentais da entrada 2 da Tabela 9.

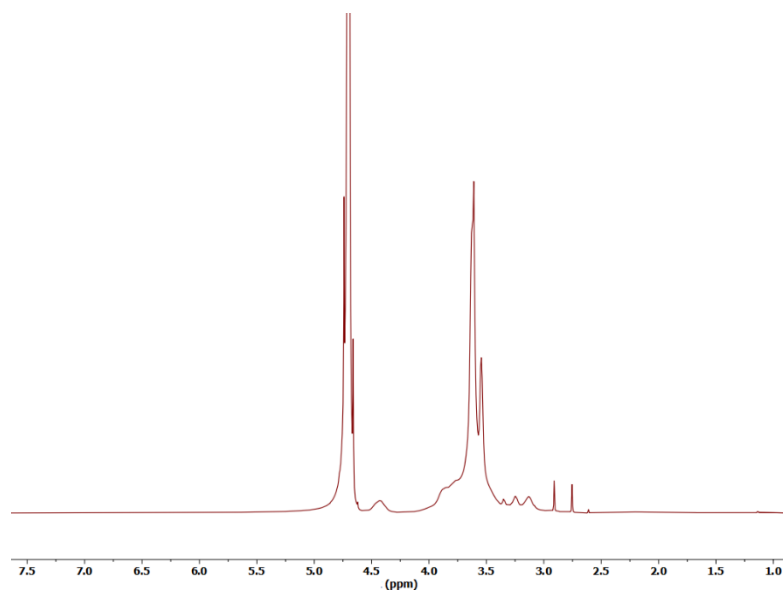


Figura C.3. Espectro de RMN de ^1H do HEC-Acetal sintetizado nas condições experimentais da entrada 3 da Tabela 9.

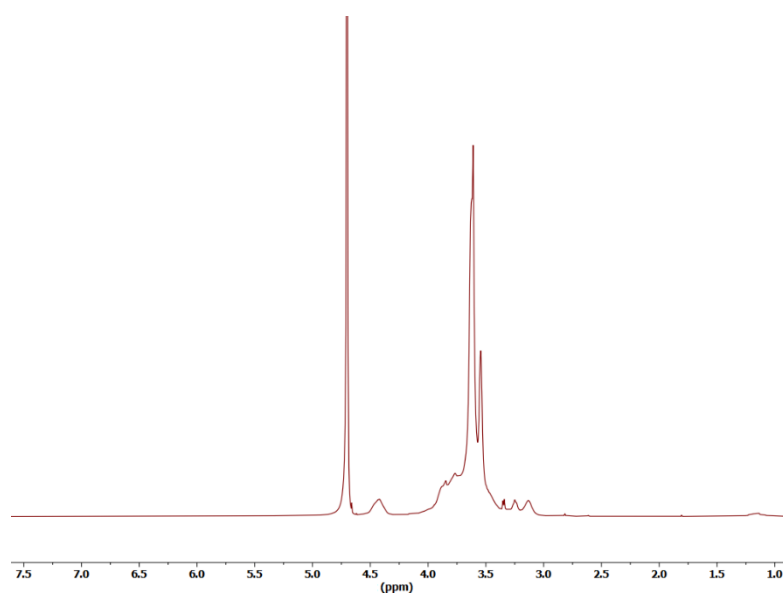


Figura C.4. Espectro de RMN de ^1H do HEC-Acetal sintetizado nas condições experimentais da entrada 4 da Tabela 9.

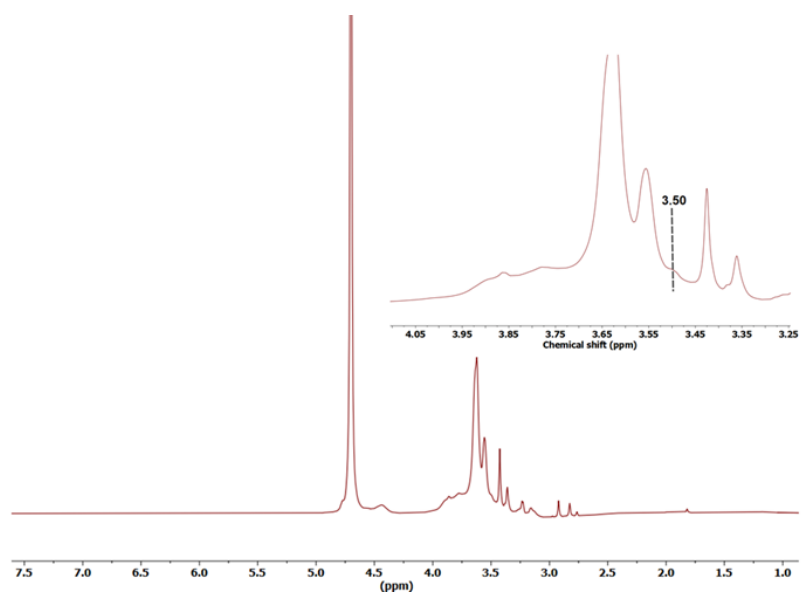


Figura C.5. Espectro de RMN de ^1H do HEC-Acetal sintetizado nas condições experimentais da entrada 5 da Tabela 9.

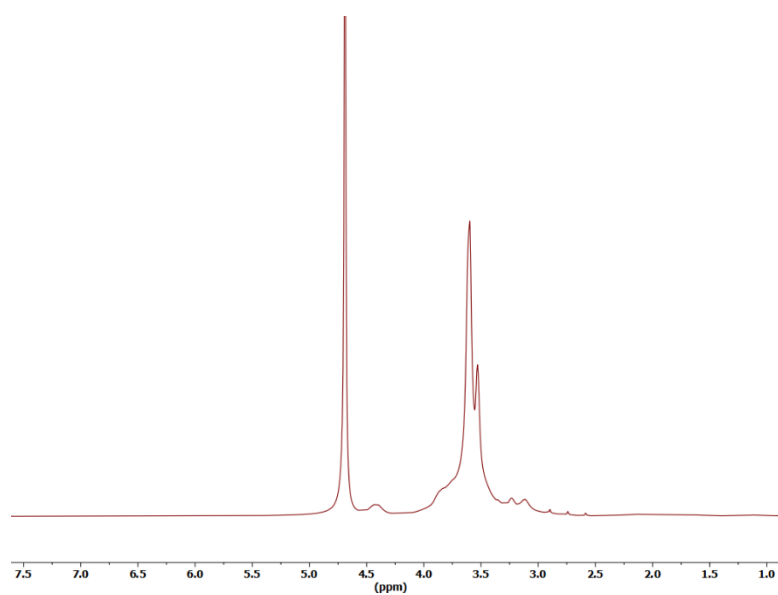


Figura C.6. Espectro de RMN de ^1H do HEC-Acetal sintetizado nas condições experimentais da entrada 6 da Tabela 9.

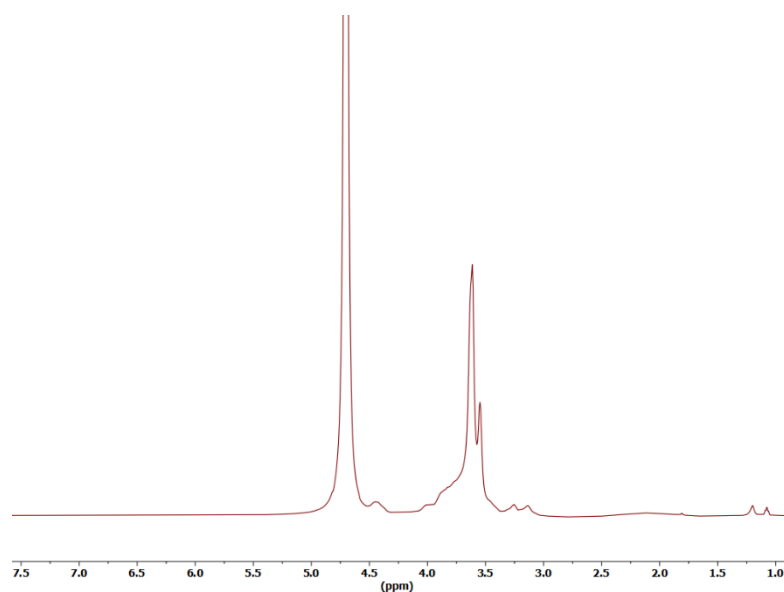


Figura C.7. Espectro de RMN de ^1H do HEC-Acetal sintetizado nas condições experimentais da entrada 7 da Tabela 9.

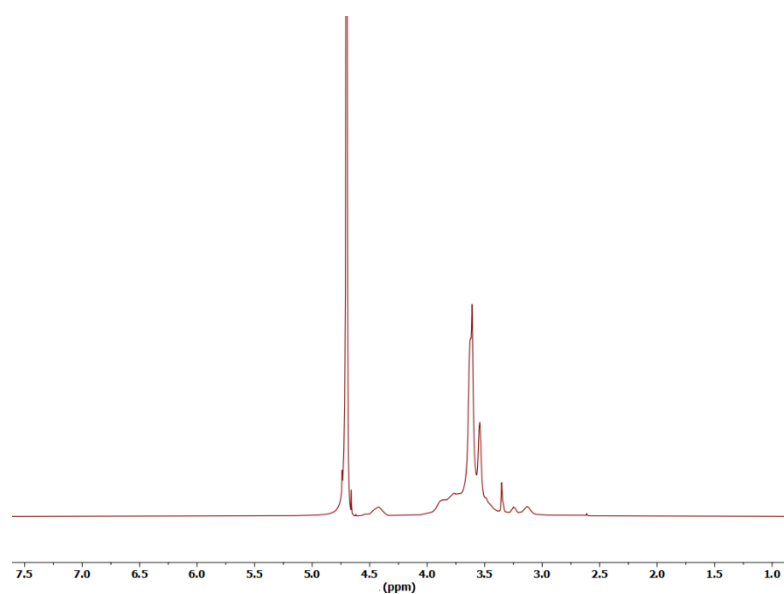


Figura C.8. Espectro de RMN de ^1H do HEC-Acetal sintetizado nas condições experimentais da entrada 8 da Tabela 9.

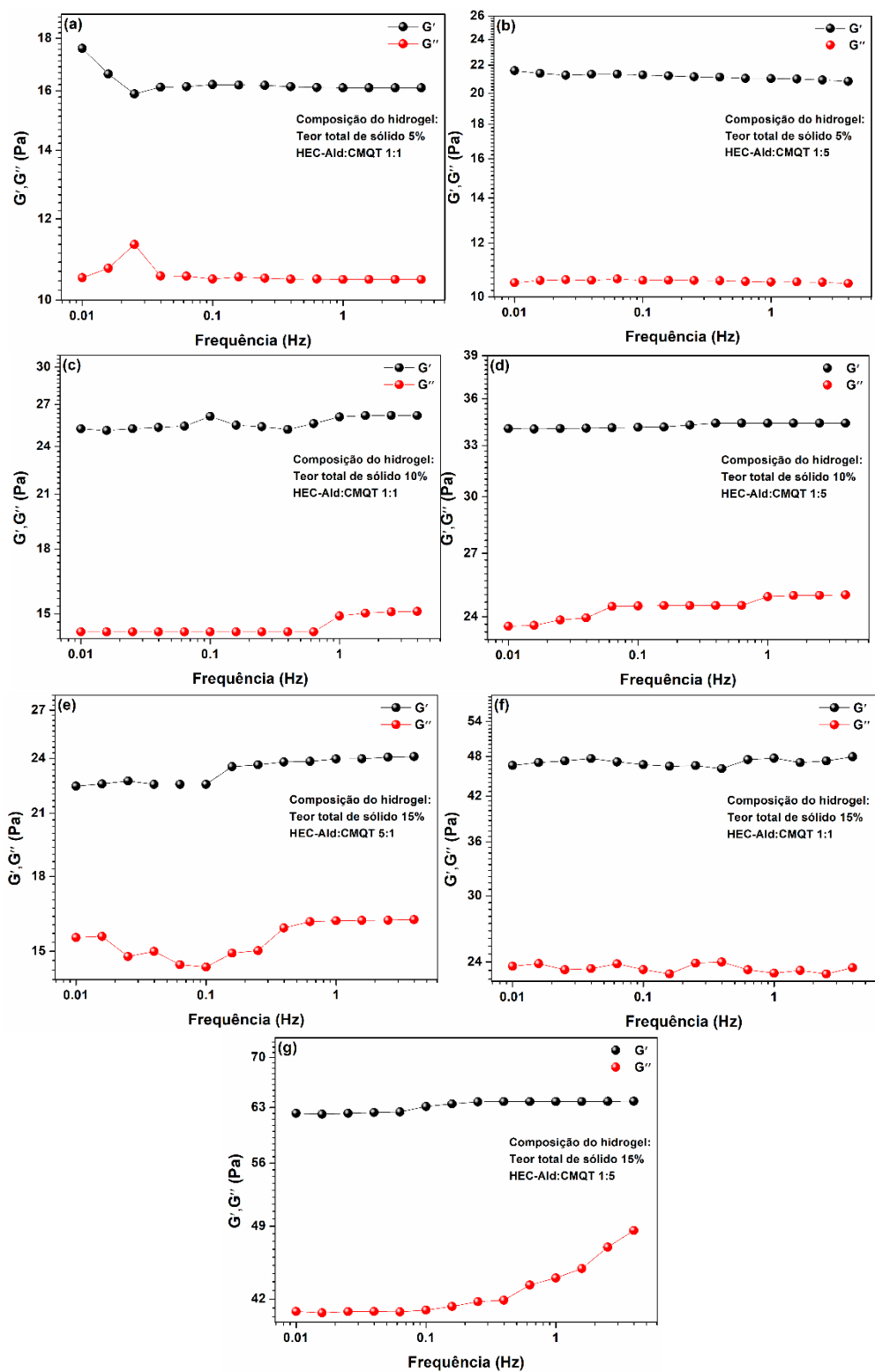


Figura C.9. Curvas representativas dos módulos G' e G'' dos hidrogéis HEC-Ald/CMQT preparados. Os experimentos foram realizados na temperatura de 37 °C.

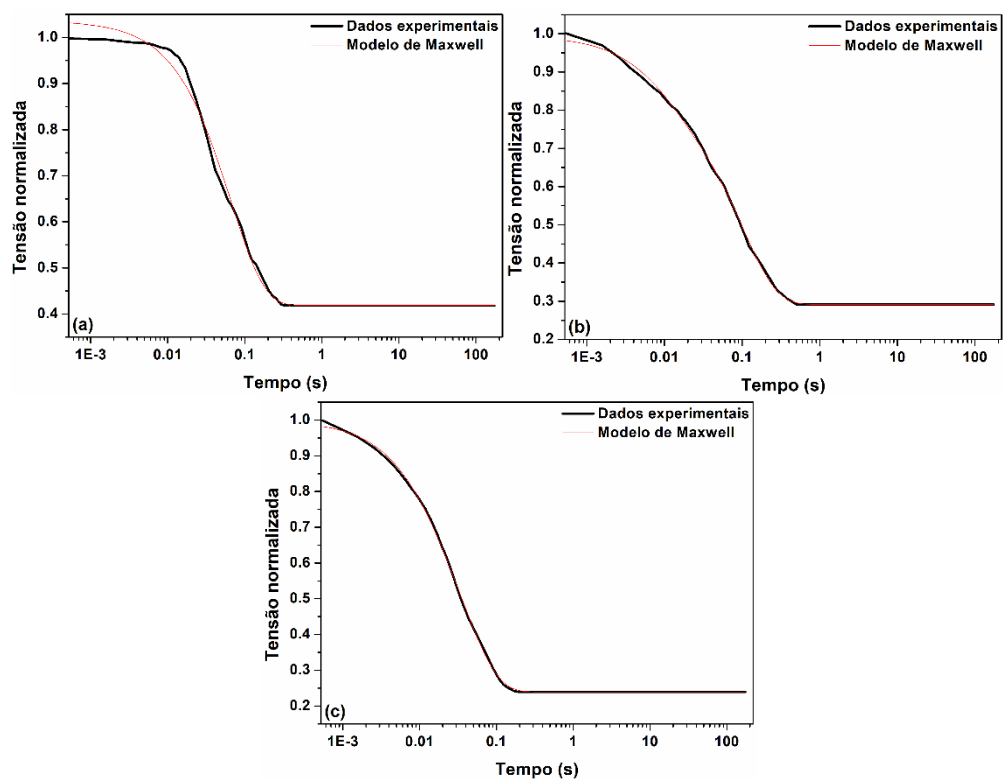


Figura C.10. Modelo de Maxwell do relaxamento de tensão do hidrogel HEC-Ald/CMQT na deformação aplicada de 1% (a), 10% (b) e 100% (c).

Apêndice D – Informações complementares do Capítulo 6

Tabela D.1. Parâmetro f dos hidrogéis intumescidos em diferentes sais.

Hidrogel	Concentração sal (mmol L ⁻¹)	Parâmetro f		
		NaCl	CaCl ₂	AlCl ₃
PEC-vap 1:1	10	1,162 ± 0,036	1,914 ± 0,034	1,920 ± 0,049
	50	1,020 ± 0,004	1,843 ± 0,037	1,871 ± 0,046
	100	0,972 ± 0,035	1,822 ± 0,021	1,839 ± 0,012
	150	0,772 ± 0,050	1,756 ± 0,051	1,760 ± 0,010
	200	0,610 ± 0,010	1,731 ± 0,040	1,748 ± 0,023
PEC-vap 2:1	10	1,091 ± 0,016	1,791 ± 0,066	1,800 ± 0,040
	50	1,076 ± 0,008	1,340 ± 0,012	1,400 ± 0,065
	100	0,895 ± 0,011	1,300 ± 0,071	1,350 ± 0,013
	150	0,616 ± 0,020	1,290 ± 0,038	1,303 ± 0,037
	200	0,585 ± 0,010	0,9,7 ± 0,040	1,251 ± 0,042
PEC-vap 3:1	10	1,075 ± 0,021	1,701 ± 0,023	1,780 ± 0,031
	50	0,911 ± 0,031	1,609 ± 0,019	1,694 ± 0,020
	100	0,839 ± 0,025	1,340 ± 0,075	1,473 ± 0,013
	150	0,460 ± 0,021	1,338 ± 0,048	1,444 ± 0,004
	200	0,442 ± 0,050	1,190 ± 0,039	1,202 ± 0,015
PEC-vap 1:2	10	1,001 ± 0,010	1,748 ± 0,030	1,820 ± 0,046
	50	0,928 ± 0,021	1,440 ± 0,040	1,575 ± 0,051
	100	0,840 ± 0,053	1,398 ± 0,057	1,407 ± 0,033
	150	0,528 ± 0,047	1,362 ± 0,013	1,400 ± 0,024
	200	0,590 ± 0,036	1,251 ± 0,038	1,390 ± 0,011
PEC-vap 1:3	10	1,005 ± 0,005	1,770 ± 0,040	1,800 ± 0,075
	50	0,950 ± 0,025	1,641 ± 0,013	1,793 ± 0,080
	100	0,835 ± 0,030	1,500 ± 0,017	1,700 ± 0,051
	150	0,521 ± 0,064	1,488 ± 0,029	1,689 ± 0,020
	200	0,470 ± 0,032	1,356 ± 0,060	1,425 ± 0,011
PEC-conv 1:1	10	1,381 ± 0,050	1,408 ± 0,022	1,435 ± 0,012
	50	1,580 ± 0,041	1,941 ± 0,030	2,041 ± 0,021
	100	1,211 ± 0,040	1,938 ± 0,011	1,971 ± 0,022
	150	0,420 ± 0,020	1,899 ± 0,020	1,934 ± 0,004
	200	0,350 ± 0,010	1,878 ± 0,037	1,900 ± 0,027
PEC-conv 2:1	10	0,488 ± 0,060	1,241 ± 0,058	1,304 ± 0,050
	50	1,382 ± 0,052	1,733 ± 0,019	1,853 ± 0,030
	100	1,253 ± 0,048	1,566 ± 0,004	1,820 ± 0,051
	150	0,420 ± 0,043	1,488 ± 0,031	1,697 ± 0,034
	200	0,370 ± 0,013	1,466 ± 0,051	1,588 ± 0,089
PEC-conv 3:1	10	0,520 ± 0,034	0,919 ± 0,019	1,204 ± 0,071
	50	1,107 ± 0,023	1,531 ± 0,020	1,800 ± 0,070
	100	1,130 ± 0,004	1,471 ± 0,137	1,603 ± 0,002
	150	0,410 ± 0,011	1,398 ± 0,102	1,400 ± 0,005
	200	0,360 ± 0,018	1,386 ± 0,067	1,389 ± 0,040
PEC-conv 1:2	10	0,610 ± 0,009	0,891 ± 0,024	0,910 ± 0,080
	50	1,250 ± 0,011	1,284 ± 0,017	1,811 ± 0,020
	100	1,200 ± 0,012	1,235 ± 0,013	1,400 ± 0,011
	150	0,542 ± 0,034	0,781 ± 0,023	1,393 ± 0,024
	200	0,410 ± 0,024	0,516 ± 0,012	1,390 ± 0,019
PEC-conv 1:3	10	0,620 ± 0,004	0,986 ± 0,028	1,031 ± 0,040
	50	1,318 ± 0,041	1,328 ± 0,041	1,412 ± 0,030
	100	1,119 ± 0,031	1,280 ± 0,029	1,346 ± 0,010
	150	0,371 ± 0,050	0,508 ± 0,011	1,204 ± 0,007
	200	0,312 ± 0,086	0,481 ± 0,020	1,194 ± 0,012