



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LEONIRA MORAIS DA SILVA SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS À BASE DE GALACTOMANANA OXIDADA
E CARBOXIETILQUITOSANA PARA ENGENHARIA DE TECIDOS**

FORTALEZA

2021

LEONIRA MORAIS DA SILVA SOUSA

CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS À BASE DE GALACTOMANANA OXIDADA E
CARBOXIETILQUITOSANA PARA ENGENHARIA DE TECIDOS

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor (a) em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jeanny da Silva Maciel.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S697c Sousa, Leonira Morais da Silva.

Caracterização de hidrogéis à base de galactomanana oxidada e carboxietilquitosana para engenharia de tecidos / Leonira Morais da Silva Sousa. – 2021.

124 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Jeanny da Siva Maciel.

1. Galactomanana *Cassia fistula*. 2. Hidrogéis. 3. Suportes porosos. 4. Quitosana. 5. Aplicação biomédica. I. Título.

CDD 540

LEONIRA MORAIS DA SILVA SOUSA

CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS À BASE DE GALACTOMANANA OXIDADA E
CARBOXIETILQUITOSANA PARA ENGENHARIA DE TECIDOS

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor (a) em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jeanny da Silva Maciel.

Aprovada em: 19/11/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Jeanny da Silva Maciel (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Pablyana Leila Rodrigues da Cunha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Durcilene Alves da Silva
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Prof.^a Dra. Antonia Fádía Valentim de Amorim
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof.^a Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar em seus caminhos, às vezes não compreendidos, porém sempre certos. Por ter permitido meu crescimento e me dado a honra de conviver com pessoas compreensivas e carinhosas, as quais sou muito grata.

Aos meus Filhos, Larissa e Samuel por serem minha maior motivação e me lembrarem que sempre tenho que seguir em frente apesar de tudo.

Ao meu esposo Maciano por toda paciência e por nunca ter soltado a minha mão.

À minha querida mãe Maria e minha vó Bia, pelo apoio, carinho, educação, respeito, confiança e incentivo em todos os momentos da minha vida. Além de suas orações em minha intenção

À minha querida Tia Corrinha, minha segunda mãe, por todo amor e dedicação a mim concedido.

Às minhas queridas irmãs, Nilda e Jéssyka e meu irmão Leonardo, pelo carinho, amizade e companheirismo em todos os momentos.

À minha orientadora, Profa. Jeanny da Silva Maciel, pela acolhida, dedicação, amizade, atenção e, principalmente, pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

A todos os meus amigos e colegas de bancada do Laboratório de Polímeros (LabPol), pelo apoio e ajuda na realização dos experimentos e pela convivência sempre alegre e divertida. Em especial a minha panelinha, Laís, Everton, Irisvan, Vanessa, Raelle, Matheus, Ribamar, Neto e Rhamon que tornaram os meus dias mais alegres.

À Profa. Judith Pessoa por se fazer tão presente no laboratório e sempre nos incentivar.

Aos professores Adonay, Pablyana e Regina Célia por aceitarem participar da minha banca de qualificação contribuindo grandemente para escrita final da tese.

À SEDUC por ter me concedido o afastamento das minhas atividades profissionais para realização desse doutorado.

À Central analítica da UFC pelas análises realizadas.

Ao CENAUREM pelas análises de RMN.

À Célia, secretária do PGQUIM por ser tão prestativa e atenciosa com os alunos.

À FUNCAP pela concessão da bolsa de pós-graduação.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

“Seja menos curioso pelas pessoas e mais curioso para as ideias.”

Marie Curie

RESUMO

A crescente demanda por órgão e tecidos e o desejo de reduzir as cirurgias tradicionais, além da incapacidade de atender toda a demanda, levaram ao rápido desenvolvimento da engenharia de tecido. Entre os biomateriais utilizados na engenharia de tecidos estão os suportes porosos (*scaffolds*), os quais são matrizes porosas que imitam a matriz extracelular auxiliando na diferenciação, proliferação e biossíntese celular para o desenvolvimento de novos tecidos. A utilização de polímeros naturais em processos biológicos apresenta algumas vantagens como: biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade dos subprodutos gerados na degradação. Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de hidrogéis de galactomanana de *Cassia fistula* oxidada interligada com carboxietilquitosana (CEQ). A galactomanana de *Cassia fistula* (GCF) foi oxidada obtendo-se os graus de oxidação 10, 20, 50 e 80%. Foram preparados hidrogéis a partir da interação do polissacarídeo oxidado em 3 diferentes graus de oxidação e com a quitosana carboxietilada com 2 graus diferentes de substituição. Os hidrogéis CEQB/CF50 apresentaram maiores valores de módulo de elasticidade (G') (2,3 kPa), enquanto o hidrogel CEQA/CF10 apresentou apenas 2,1 Pa. O aumento do grau de oxidação e a diminuição do grau de modificação da quitosana aumentam o caráter elástico do hidrogel. O tempo de geleificação obtidos pelas técnicas de inversão de tubo, barra magnética e reômetro foram bem próximo entre si, variaram em média entre 33 e 158 s, para os hidrogéis mais reticulados e menos reticulados, respectivamente. As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos hidrogéis liofilizados (suportes porosos) mostraram alta porosidade com poros heterogêneos. Observou-se que a média de tamanho de poro é proporcional ao grau de oxidação da GCF. Os ensaios mecânicos demonstraram que os *scaffolds* apresentaram comportamento elástico com valores de módulo de compressão variando entre 5,5 e 8,3 kPa. Nenhum dos *scaffolds* produzidos apresentaram toxicidade. Os *scaffolds* CEQA/CF20 e CEQB/CF20 apresentaram boa capacidade bactericida frente às bactérias gram-positivas *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos tornam esses *scaffolds* bons candidatos a serem utilizados na engenharia de tecidos.

Palavras-chave: suportes porosos; hidrogéis; galactomanana *Cassia fistula*; quitosana; aplicação biomédica.

ABSTRACT

The growing demand for organ and tissue and the desire to reduce traditional surgeries, in addition to the inability to meet the full demand, have led to the rapid development of tissue engineering. Among the biomaterials used in tissue engineering are porous supports (*scaffolds*) which are porous matrices that mimic the extracellular matrix, aiding in cell differentiation, proliferation and biosynthesis for the development of new tissues. The use of natural polymers in biological processes has some advantages such as: biodegradability, biocompatibility, low toxicity of by-products generated in degradation. This work aims to develop hydrogels from galactomannan extracted from the *Cassia fistula* plant, oxidized with sodium periodate and interconnected with chitosan modified with acrylic acid (CEQ). The galactomannan from *Cassia fistula* (GCF) was oxidized, obtaining oxidation degrees 10, 20, 50 and 80%. Hydrogels were prepared from the interaction of oxidized polysaccharide with modified chitosan. The rheological analysis showed that the CEQB/CF50 hydrogels had higher values of modulus of elasticity (G') (2.3 kPa), while the CEQA/CF10 hydrogel had only 2.1 Pa, which demonstrates that the increase in degree of oxidation and the decrease in the degree of modification of the chitosan increase the elastic character of the hydrogel. The gelling time obtained by the tube, magnetic bar and rheometer inversion techniques were very close to each other, varying on average between 192 ± 26 and 29 ± 5 s, for the more crosslinked and less crosslinked hydrogels, respectively. Scanning electron microscopy (SEM) analyzes of lyophilized hydrogels (porous supports) showed high porosity and heterogeneous pores. It was observed that the average pore size is proportional to the degree of oxidation of GCF. Mechanical tests showed that the *scaffolds* showed elastic behavior with compression modulus values ranging from 5.5 to 8.3 kPa. Cytotoxicity assays demonstrated that the *scaffolds* resulted in the conditions made in this work and do not present toxicity. CEQA/CF20 and CEQB/CF20 *scaffolds* have good bactericidal capacity against gram-positive bacteria *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. The results obtained make these *scaffolds* good candidates to be used in tissue engineering.

Keywords: porous supports; hydrogels; galactomannan *Cassia fistula*; chitosan; biomedical application.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Necessidade estimada e número de transplantes realizados no Brasil em 2023 (A); evolução anual dos doadores efetivos no Brasil –pmp (por milhão de população) (B).....	15
Figura 2 - Estrutura química da quitina e quitosana.....	24
Figura 3 - Estrutura de unidades hidrossolúveis da quitosana.....	25
Figura 4 - Síntese da carboxietilquitosana.....	26
Figura 5 - Estrutura química de uma galactomanana.....	27
Figura 6 - Árvore, sementes e galactomanana extraída das sementes de <i>Cassia fistula</i>	29
Figura 7 - Estrutura da reação de oxidação de uma unidade monossacarídica com periodato de sódio.....	30
Figura 8 - Mecanismo de formação de base de Schiff entre uma unidade de manose oxidada e β -1,4 d-glucosamina.....	31
Figura 9 - Curvas de titulação com NaOH, para GCF; CF10; CF20; CF50 E CF80 dissolvidos em cloridrato de hidroxilamina.....	52
Figura 10 - Reação de formação de oximas e liberação de ácido clorídrico.....	52
Figura 11 - Variação do pH (liberação de ácido fórmico) em relação ao tempo da reação de oxidação da GCF com periodato (A). Reação de oxidação com liberação de ácido fórmico (B).....	55
Figura 12 - Espectro na região do infravermelho para GCF e derivados oxidados (GCF, CF10, CF20, CF50 e CF80) e a expansão ao lado mostrando a região de grupo carbonil.....	56
Figura 13 - Espectro de ^1H RMN da GCF e seus derivados oxidados CF10 e CF20.....	58
Figura 14 - Espectro ^1H - ^{13}C HSQC CF10 (A) e CF20 (B).....	59
Figura 15 - Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de CF10 a 70 °C.....	60
Figura 16 - Possíveis estruturas da galactomanana após a oxidação (A); galactose oxidada (B); dupla oxidação da galactose (C); hemiacetal intra-residual (D) e (F); aldeído hidratados (F) e hemialdal (G).....	61

Figura 17 - Espectro na região do infravermelho da quitosana e derivados carboxietilados na forma de sal de sódio (quitosana, CEQB e CEQA.).....	63
Figura 18 - (i) estrutura da carboxietil quitosana unidade acetilada (A), unidade monocarboxietilada (B), unidade com dupla enxertia (C), unidade d-glucosamina (D). (ii) espectro de ¹ H RMN para quitosana purificada (QP) e derivados CEQA e CEQB em D ₂ O/DCl a 70 °C.....	65
Figura 19 - Variação da carboxietilquitosana em diferentes valores de pH	68
Figura 20 - Solubilidade das amostras de CEQB e quitosana purificada em diferentes pH, a 25 °C e concentração de 2% m/v.....	69
Figura 21 - Aparência macroscópica das soluções de CEQA e CEQB comparadas à da quitosana não modificada (todas na concentração de 2,0% m/v).....	70
Figura 22 - Esquema ilustrando a formação do hidrogel de carboxietilquitosana e galactomanana oxidada.....	71
Figura 23 - Espectro na região do infravermelho dos <i>scaffolds</i> e seus percussores (CEQA, CF10 E CEQA/CF10)-(A); (CEQB, CF50 e CEQB/CF50)-(B); (CEQA/CF10, CEQA/CF20, CEQA/CF50)-(C) e (CEQB/CF10, CEQB/CF20, CEQB/CF50)-(D).....	73
Figura 24 - Formação do hidrogel CEQB/CF50 pelo método da barra magnética (A) e pelo método da inversão de tubo (B) ambas a 37 °C.....	75
Figura 25 - Variação do módulo de armazenamento (G') e do módulo de perda (G'') para CEQB/CF (A); para os hidrogéis CEQB/CF50; CEQA/CF50; CEQA/CF20; CEQB/CF20; CEQA/CF10 e CEQB/CF10 (B E C); variação do módulo de armazenamento (G') para os hidrogéis CEQB/CF50; CEQA/CF50; CEQA/CF20 E CEQB/CF20 a 37 °C (D).....	77
Figura 26 - Variação do módulo de armazenamento (G') em função do tempo para os hidrogéis CEQB/CF50 (A) e CEQA/CF50 (B) em diferentes proporções. Variação do módulo de armazenamento (G') do tempo para o hidrogel CEQ50/CF50 variando a	

	concentração das soluções (C). Módulo de armazenamento (G') em função do tempo para CEQB/CF50 (2%) (proporção de 1:1) a diferentes temperaturas (D).....	80
Figura 27-	Intumescimento dos <i>scaffolds</i> (CECA/CF10; CECA/CF20; CECA/CF50; CECB/CF10; CECB/CF20 E CECB/CF50) em solução tampão de pbs (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 7,4) a temperatura ambiente (26±2 °C) por um período de 2 horas intumescimento dos <i>scaffolds</i>	82
Figura 28 -	Porosidade e tamanho de poros dos <i>scaffolds</i> (A) CEQB/CF10; CEQB/CF20; CEQB/CF50 E (B) CEQA/CF10; CEQA/CF20; CEQA/CF50.....	84
Figura 29 -	Microscopia eletrônica de varredura das amostras CEQA/CF10; CEQA/CF20; CEQA/CF50. A linha i mostra as imagens com magnificação em 500x e a linha ii em 200x.....	85
Figura 30 -	Microscopia eletrônica de varredura das amostras CEQB/CF10; CEQB/CF20; CEQB/CF50 dos <i>scaffolds</i> . A coluna i mostra as imagens com magnificação em 500x e a coluna ii em 200x.....	85
Figura 31 -	Histogramas das curvas de distribuição dos tamanhos de poros dos <i>scaffolds</i>	86
Figura 32 -	Teste de compressão do <i>scaffold</i> (CEQA/CF20) intumescido em tampão PBS (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 7,4). Ensaio realizado a 37 °C.....	89
Figura 33 -	Curva de tensão-deformação (A e B) e módulo de compressão (C) dos <i>scaffolds</i> liofilizados e intumescidos em tampão PBS (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 7,4), experimento realizado a 37 °C.....	90
Figura 34 -	Curvas de degradação <i>in vitro</i> para os <i>scaffolds</i> de CEQA (A) e CEQB (B), em tampão PBS (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 7,4) experimento realizado a 37 °C.....	93
Figura 35 -	Curvas de análises termogravimétricas (A e C) e DTG (B e C) das amostras QP; GCF; CEQA; CEQB e os <i>scaffolds</i> , realizados em atmosfera de ar sintético.....	95
Figura 36 -	Avaliação da citotoxicidade da galactomanana da <i>cassia fistula</i> em células após 72 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO ₂ pelo ensaio de mtt. Controle: sem tratamento com polissacarídeo.	

	As barras representam as médias, com as linhas verticais indicando os desvios padrão, n = 3, * p < 0,01.....	97
Figura 37 -	Desenvolvimento celular para as amostras CEQA, CEQB, CF20 e CF50.....	98
Figura 38	Proliferação das células L929 nos <i>scaffolds</i> CEQA/CF20; CEQB/CF20; CEQA/CF50 e CEQB/CF50. As colunas representam os resultados para os dias 1, 4, 7, 14 e 21.....	100
Figura 39	Atividade antibacteriana dos <i>scaffolds</i> CEQA/CF20 e CEQB/CF20. A, E) <i>staphylococcus epidermidis</i> atcc 12228; B, F) <i>staphylococcus aureus</i> atcc 29213; C, G) <i>staphylococcus aureus</i> atcc 43300 – mrsa; D, H) <i>pseudomonas aeruginosa</i> atcc 27853. Significância estatística: * p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001. Ausência de significância estatística: # p > 0,05. Os dados são apresentados como média ± epm (n = 3). Ufc: unidades formadoras de colônias bacterianas.....	101
Figura 40	Tempo de geleificação dos hidrogéis, preparados com diferentes graus de oxidação e volumes iguais do derivado oxidado e de CEQ a 37 °C.....	104
Figura 41	Placas de petri contendo bactérias não tratadas (controle) e bactérias tratadas com os <i>scaffolds</i> CEQA/CF20 e CEQB/CF20. <i>Staphylococcus epidermidis</i> atcc 12228: A) controle; B) tratada com CEQA/CF20; C) tratada com CEQB/CF20. <i>Staphylococcus aureus</i> atcc 29213: D) controle; E) tratada com CEQA/CF20; F) tratada com CEQB/CF20. <i>Staphylococcus aureus</i> atcc 43300 – mrsa: G) controle; H) tratada com CEQA/CF20; I) tratada com CEQB/CF20. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> atcc 27853: J) controle; K) tratada com CEQA/CF20; L) tratada com CEQB/CF20.....	105
Figura 42-	Imagens 3D da bactéria <i>Staphylococcus epidermidis</i> por mfa. Não tratada (A e C), tratamento com o <i>scaffold</i> CEQB/CF20 (B e D). Imagens com resolução de 512x512 pixels. Gráficos de tamanho e rugosidade média em E e F, respectivamente.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Trabalhos recentes que utilizaram polissacarídeos na preparação de diferentes tipos de <i>scaffolds</i>	20
Tabela 2 - Reação de oxidação com NaIO_4	53
Tabela 3 - Distribuição da massa molar da GCF e derivados oxidados.....	54
Tabela 4 - Tempo de geleificação dos hidrogéis, preparados com diferentes graus de oxidação e volumes iguais do derivado oxidado e de CEQ a 37 °C.....	74
Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	103
Tabela 6 - Caracterização das diferentes propriedades dos hidrogéis de polissacarídeos modificados.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEQ	Carboxietilquitosana
CEQA	Carboxietilquitosana com maior grau de modificação
CEQB	Carboxietilquitosana com menor grau de modificação
GCF	Galactomanana da <i>Cassia fistula</i>
CF10.	<i>Cassia fistula</i> oxidada, grau de oxidação teórico de 10%
CF20	<i>Cassia fistula</i> oxidada, grau de oxidação teórico de 20%
CF50	<i>Cassia fistula</i> oxidada, grau de oxidação teórico de 50%
QT	Quitosana
CEQA/CF10	<i>Scaffold</i> formado com a mistura de carboxietilquitosana com o maior grau de modificação e <i>Cassia fistula</i> oxidada 10%
CEQA/CF20	<i>Scaffold</i> formado com a mistura de carboxietilquitosana com o maior grau de modificação e <i>Cassia fistula</i> oxidada 20%
CEQA/CF50	<i>Scaffold</i> formado com a mistura de carboxietil quitosana com o maior grau de modificação e <i>Cassia fistula</i> oxidada 50%
CEQB/CF10	<i>Scaffold</i> formado com a mistura de carboxietilquitosana com o menor grau de modificação e <i>Cassia fistula</i> oxidada 10%
CEQB/CF20	<i>Scaffold</i> formado com a mistura de carboxietilquitosana com o menor grau de modificação e <i>Cassia fistula</i> oxidada 20%
CEQB/CF50	<i>Scaffold</i> formado com a mistura de carboxietilquitosana com o menor grau de modificação e <i>Cassia fistula</i> oxidada 50%
G'	Módulo de armazenamento
G''	Módulo de perda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Engenharia de tecidos.....	15
1.2	<i>Scaffolds</i>	16
1.3	Polissacarídeos utilizados na engenharia de tecidos.....	18
1.3.1	<i>Derivados hidrossólúveis de Quitosana</i>	23
1.3.2	<i>Galactomanana e derivados oxidados</i>	27
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	Objetivo geral.....	33
2.2	Objetivos Específicos.....	33
3	METODOLOGIA.....	34
3.1	Materiais.....	34
3.2	Extração da galactomanana de Cassia fistula.....	34
3.3	Oxidação da galactomanana com periodato.....	34
3.3.1	<i>Determinação do grau de oxidação</i>	35
3.4	Purificação da Quitosana.....	35
3.5	Carboxietilação da Quitosana.....	36
3.6	Caracterização dos materiais utilizados.....	36
3.6.1	<i>Análises de distribuição da massa molar por cromatografia de permeação em gel (GPC) da GCF e seus derivados</i>	36
3.6.2	<i>Determinação da viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica da quitosana</i>	37
3.6.3	<i>Determinação do grau de desacetilação da quitosana e grau de substituição da carboxietilquitosana</i>	38
3.6.4	<i>Avaliação da solubilidade em diferentes pH da carboxietilquitosana em meio aquoso</i>	39
3.6.5	<i>Análise Elementar</i>	39
3.6.6	<i>Ressonância Magnética Nuclear</i>	39
3.6.7	<i>Análise por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i> ..	40
3.6.8	<i>Análise da citotoxicidade da GCF</i>	40
3.6.9	<i>Análise da citotoxicidade dos derivados CEQA, CEQB, CF20 e CF50</i>	41

3.7	Síntese dos hidrogéis e scaffolds.....	41
3.7.1	Caracterização dos scaffolds.....	42
3.7.1.1	<i>Tempo de geleificação.....</i>	42
3.7.1.2	<i>Análises Reológicas.....</i>	42
3.7.1.3	<i>Análises de intumescimento.....</i>	43
3.7.1.4	<i>Porosidade dos scaffolds.....</i>	43
3.7.1.5	<i>Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</i>	44
3.7.1.6	<i>Tamanho de poros.....</i>	44
3.7.1.7	<i>Análises Mecânicas.....</i>	44
3.7.1.8	<i>Teste de Degradação.....</i>	45
3.7.1.9	<i>Análise termogravimétrica (TGA).....</i>	45
3.7.1.10	<i>Análise da toxicidade in vitro da GCF.....</i>	46
3.7.1.11	<i>Cultura de células in vitro e semeadura nos scaffolds.....</i>	46
3.7.1.12	<i>Avaliação da citocompatibilidade dos scaffolds.....</i>	47
3.7.1.13	<i>Avaliação do potencial antibacteriano in vitro.....</i>	48
3.7.1.14	<i>Análise do efeito antibacteriano do scaffold CEQB/CF20 por microscopia de força atômica (MFA).....</i>	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1	Galactomanana e derivados oxidados.....	51
4.1.1	<i>Rendimento do isolamento da galactomanana da Cassia fistula</i>	51
4.1.2	<i>Determinação do grau de oxidação das amostras dos derivados oxidados.....</i>	51
4.1.3	<i>Estimativa da distribuição da massa molar por GPC.....</i>	53
4.1.4	<i>Espectroscopia de Absorção no Infravermelho.....</i>	56
4.1.5	<i>Análise de Ressonância Magnética Nuclear.....</i>	57
4.2	Quitosana e seus derivados carboxietilados.....	62
4.2.1	<i>Espectroscopia de Absorção no Infravermelho.....</i>	62
4.2.2	<i>Análise de Ressonância Magnética Nuclear.....</i>	64
4.2.3	<i>Determinação da viscosidade intrínseca, massa molar viscosimétrica média, grau de desacetilação da quitosana e grau de substituição dos derivados carboxietilados.....</i>	66
4.2.4	<i>Solubilidade da quitosana e seus derivados e reação de formação dos hidrogéis.....</i>	67

4.2.5	<i>Espectroscopia de Absorção no Infravermelho dos scaffolds....</i>	72
4.2.6	<i>Tempo de Geleificação.....</i>	74
4.2.7	<i>Análise Reológica.....</i>	76
4.2.8	<i>Análise de intumescimento.....</i>	82
4.2.9	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura, porosidade e tamanho de poros.....</i>	83
4.2.10	<i>Análise Mecânica.....</i>	89
4.2.11	<i>Teste de degradação.....</i>	92
4.2.12	<i>Análise termogravimétrica.....</i>	94
4.2.13	<i>Citotoxicidade da galactomanana da <i>Cassia fistula</i>.....</i>	97
4.2.14	<i>Viabilidade Celular.....</i>	98
4.2.15	<i>Avaliação do potencial antibacteriano <i>in vitro</i>.....</i>	102
4.2.16	<i>Análise do efeito antibacteriano do scaffold CEQB/CF20 por microscopia de força atômica (MFA).....</i>	106
5	CONCLUSÃO.....	110
	REFERÊNCIAS.....	111

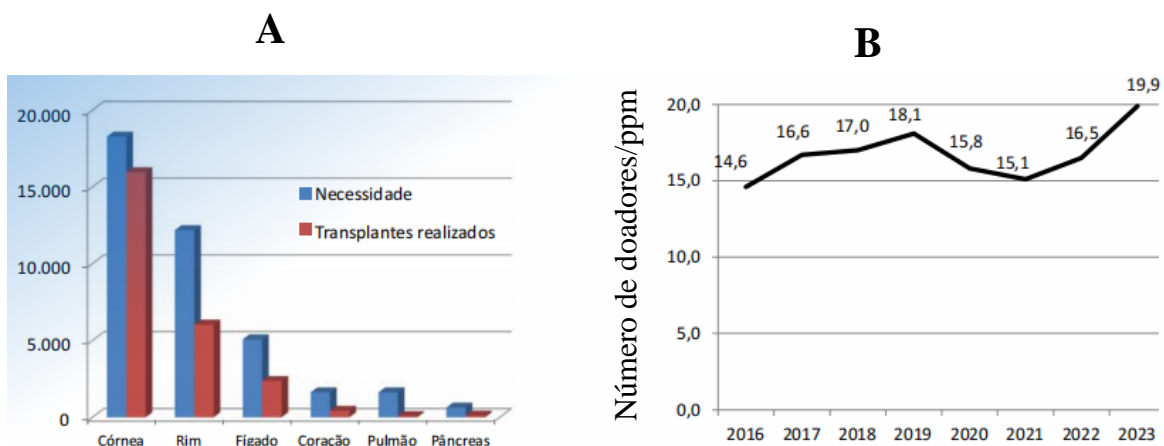
1 INTRODUÇÃO

1.1 Engenharia de tecidos

A engenharia de tecido é uma área interdisciplinar que busca o desenvolvimento de biomateriais em laboratório a partir de materiais sintéticos ou naturais para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido (Steffens *et al.*, 2018). O termo surgiu inicialmente em meados de 1980. O crescente interesse pela engenharia de tecido veio devido a limitação do número de doadores frente à grande demanda de reparar órgãos e tecidos danificados por doenças ou lesões, além da possibilidade de rejeição ocasionada pelo sistema imunológico do paciente (Toniutto *et al.*, 2017).

É muito preocupante ver a desproporção entre a alta demanda por transplantes de órgãos e o baixo índice de transplantes realizados. Segundo a Associação Brasileira de Transplantes e Órgãos (ABTO, 2023), em dezembro de 2023 no Brasil, se encontravam na fila de transplante cerca de 59 mil pacientes. Na Figura 1 é possível ver a diferença entre o número de transplantes realizados e a necessidade real de transplante só no Brasil durante ano de 2023.

Figura 1 - Necessidade estimada e número de transplantes realizados no Brasil em 2023 (A); Evolução anual dos doadores efetivos no Brasil –pmp (por milhão de população) (B)



Fonte: (ABTO, 2023).

Esse é o principal motivo das diversas pesquisas realizadas no Brasil e no mundo para melhoria das técnicas utilizadas na preparação de biomateriais. Uma maneira de tentar reverter esse déficit de doadores seria utilizar as próprias células do paciente ou um material biodegradável que pudesse promover o crescimento de células e tecidos utilizando-se de um suporte provisório. O que reduziria o tempo de espera para transplante, diminuindo o risco de rejeição e a necessidade de uma cirurgia mais complexa (Naahidi *et al.*, 2017).

1.2 *Scaffolds*

Biomaterial é por definição, qualquer substância ou mistura de substâncias, naturais ou não, utilizadas em aplicações biomédicas e que interagem em sistemas biológicos. Entre esses biomateriais estão os suportes porosos conhecidos como *scaffolds* (L. Oliveira, C. Oliveira, A. Machado *et al.*, 2010). *Scaffolds* são matrizes tridimensionais porosas e temporárias cuja principal função é auxiliar na proliferação, diferenciação e biossíntese das células, assemelhando-se à matriz extracelular (MEC), facilitando assim a formação de tecidos funcionais e órgãos (Zhang, Jun *et al.*, 2018). Os *scaffolds* devem ser projetados para facilitar a distribuição celular e guiar a regeneração do tecido em três dimensões (Ma, 2004). Além disso, um *scaffold* colocado no local da regeneração impedirá a invasão de células indesejáveis no local de ação.

Para a utilização desses biomateriais existem alguns pré-requisitos básicos entre os quais incluem: (1) biocompatibilidade é o principal pré-requisito como biomaterial, pois materiais biocompatíveis apresentam capacidade de proporcionar o crescimento e a proliferação celular. O conceito de biocompatibilidade atualmente é bem diferente do qual se usava inicialmente. Antes, a biocompatibilidade se resumia a um biomaterial inerte, ou que reagisse o menos possível com o hospedeiro. Hoje o que se espera de um biomaterial biocompatível é a interação com o meio guiando o processo para o restabelecimento dos tecidos (Oréfice *et al.*, 2012); (2) devem ter propriedades mecânicas comparáveis às do tecido no local de implantação ou propriedades mecânicas capazes de impedir que as células sejam prejudicadas por forças compressivas (Alinejad *et al.*, 2019). O *scaffold* deve ser resistente durante o processo de implantação; (3) deve ser produzido em diversos formatos e com porosidade apropriada. Uma alta porosidade, um tamanho adequado e a interligação

desses poros são necessários para facilitar a semeadura celular e difusão em toda a estrutura (Chen, Guoping; Kawazoe, 2016; Kim *et al.*, 2019). Um tamanho adequado de poro estaria na faixa entre 100 e 400 μm , necessário para o desenvolvimento celular (Oliveira, *et al.*, 2007). Um problema relacionado à porosidade é que à medida que se aumenta a porosidade ocorre uma diminuição da resistência mecânica. Já para poros muito pequenos pode ocorrer a oclusão dos poros pelas células, impedindo assim a vascularização e penetração de novas células; (5) biodegradabilidade é muitas vezes um fator essencial, pois os suportes temporários devem ser preferencialmente absorvidos pelos tecidos circundantes sem a necessidade de uma cirurgia para remoção.

O principal objetivo da engenharia de tecidos é permitir que as próprias células do corpo, ao longo do tempo substituam o suporte implantado. Os subprodutos formados durante a degradação devem ser atóxicos e sair do organismo sem interferir em outros órgãos. O ideal é que a degradação ocorra no mesmo ritmo da formação do novo tecido (Gu *et al.*, 2010; Hozumi *et al.*, 2018); e (6) mimetizar a matriz extracelular nativa (MEC), esse tipo de material facilita a regeneração celular por formar uma região semelhante ao tecido a ser substituído (Akhtar *et al.*, 2017).

Diversos métodos vêm sendo utilizados nos preparos dos *scaffolds*, entre eles os mais utilizados são:

- Método da eletrospiação, técnica que utiliza alta tensão para produzir micro e nano fibras. Uma das vantagens dessa técnica é que ela requer apenas um solvente para dispensar as nanopartículas e dissolver o polímero;

- Método da impressão 3D, técnica que utiliza a impressão para produzir camada por camada de material para fabricação do *scaffold* assistida por computador. A impressão em 3D é uma técnica vantajosa, pois permite a replicação da forma muito próxima de vários tecidos (Oréfice *et al.*, 2012).

- Liofilização ou também conhecida como separação de fase, esse método é mais usual. A técnica consiste no congelamento do hidrogel, seguida de sublimação dos cristais de gelo formados e dessorção da água sob vácuo). Os espaços antes ocupados pelo solvente agora formam os poros do *scaffold*, a vantagem desse método é a evaporação do solvente sem degradar o polímero, a não utilização de calor e de solventes orgânicos (Rasouljanboroujeni *et al.*, 2018).

1.3 Polissacarídeos utilizados na engenharia de tecidos

Hoje, a procura por materiais biodegradáveis, extraídos de fontes renováveis e que apresentem alto desempenho e um menor custo, é cada vez maior. A utilização de polímeros naturais em processos biológicos apresentam algumas vantagens como: não carcinogenicidade, mucoadesividade, biocompatibilidade, alta capacidade de encapsulamento e liberação de fármaco de forma prolongada e baixa toxicidade dos subprodutos gerados na degradação e plasticidade no processamento em uma variedade de materiais (Sumathi; Ray, 2002).

Polissacarídeos são biomacromoléculas mais abundantes na natureza. São polímeros naturais muito utilizados devido a sua grande versatilidade. Nos últimos anos, os polissacarídeos têm sido amplamente investigados em relação às suas características físico-químicas e aplicações. Esses materiais vêm sendo utilizados em diversas áreas tais como: na indústria alimentícia; cosmética; farmacêutica; biomédica, no tratamento de efluentes, entre outras. Na área biomédica, são produzidos diversos biomateriais como curativos, sistemas de liberação de fármacos, revestimentos e suportes porosos (Souza *et al.*, 2021). Os polissacarídeos são capazes de formar hidrogéis tanto por ligação covalente; polimerização; conjugação química ou esterificação.

Hidrogéis produzidos a partir de polímeros naturais apresentam, em sua maioria, diversas vantagens em relação aos sintéticos tradicionais tais como: biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades que se assemelham a matriz extracelular (Liu, Juan *et al.*, 2015). Além de serem economicamente viáveis, os polissacarídeos são mais seguros que os polímeros sintéticos (Qi *et al.*, 2020). Polissacarídeos são preferíveis na preparação de biomateriais, pois apresentam grande diversidade química e são facilmente modificados, através de diversos métodos, possibilitando assim, por exemplo, o melhoramento da biocompatibilidade, das propriedades mecânicas e biodegradabilidade. Vários derivados de polissacarídeos têm sido preparados através de modificação química de modo a melhorar as propriedades físico-químicas ou mecânicas, ampliando as possibilidades de utilização como novos biomateriais.

Os polissacarídeos mais utilizados na preparação de *scaffolds* são: alginato, quitosana, celulose, ácido hialurônico, goma xantana, goma guar, carragenana, dextrana e goma gelana (Guzelgulgen *et al.*, 2021). Na Tabela 1 são

apresentados alguns trabalhos recentes nos quais utilizam os polissacarídeos mais abundantes na preparação de *scaffolds* usados na engenharia de tecidos.

Tabela 1 - Trabalhos recentes que utilizaram polissacarídeos na preparação de diferentes tipos de *scaffolds*

Composição	Técnica de fabricação	Tipo de scaffold	Aplicação	Referência
Carboxietilquiosana/dextran a oxidada/ nano-hidroxiapatita	Injetável	Hidrogel	Regeneração de tecido ósseo	(Cao <i>et al.</i> , 2021)
Alginato/Gelatina	Eletrofiação	Nanofibra	Engenharia de tecidos	(Ghitman <i>et al.</i> , 2021)
Glucoxilana	Liofilização	3D scaffold	Engenharia de tecidos	(Guzelgulgen <i>et al.</i> , 2021)
Alginato oxidado/Gelatina/ZnO ₂	Liofilização	3D scaffold	Regeneração de cartilagem	(Ghanbari <i>et al.</i> , 2021)
Gelatina com metacrilato e Quitosana com metacrilato	Liofilização	3D scaffold	Engenharia de tecidos	(Joshi <i>et al.</i> , 2021)

Quitosana e goma Gelana	Liofilização	3D <i>scaffold</i>	Regeneração de tecido ósseo	(de Oliveira, Ariel C. <i>et al.</i> , 2020)
Quitosana/Sulfato de condroitina	Injetavel	Hidrogel	Regeneração da pele	(Sharma <i>et al.</i> , 2021)
alginato/polivinilalcool e fibroína da seda	Liofilização	3D <i>scaffold</i>	Regeneração de tecido ósseo	(Sangkert <i>et al.</i> , 2021)
Alginato/fibrogênio	Liofilização	3D <i>scaffold</i>	Regeneração da pele	(Solovieva <i>et al.</i> , 2018)
TiO ₂ -quitosana/Alginato de sódio	Evaporação de solvente	3D <i>scaffold nanocompósito</i>	Engenharia de tecidos	(Kolathupalayam; Rangaraj; Subramani, 2020)
Carboxietilquitosana/Goma do cajueiro oxidada	Liofilização	3D <i>scaffold</i>	Engenharia de tecidos	(Carlos <i>et al.</i> , 2021)

N-succinil quitosana/galactomanana	Injetável	Hidrogel	Engenharia de tecidos	(Lucas de Lima <i>et al.</i> , 2020)
Alginato	Evaporação de solvente	3D <i>scaffold</i>	Regeneração de tecido ósseo	(Iskandar <i>et al.</i> , 2019)
Quitosana/Polivinilaalcol	Eletrofiação	Nanofibras	Regeneração do sistema neural	(Sadeghi; Moztaezadeh; Aghazadeh Mohandesi, 2019)
Gelatina-policaprolactona- nanohidroxiapatita	Eletrofiação	Nanofibras	Regeneração de tecido ósseo	(Gautam <i>et al.</i> , 2021)
Gelatina/alginato	Impressão 3D	3D <i>scaffold</i>	Engenharia de tecidos	(Curti <i>et al.</i> , 2021)

Fonte: elaborada pela autora

1.3.1 Derivados hidrossólúveis de Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo linear obtido a partir da desacetilação da quitina, por tratamento com bases fortes ou por métodos microbiológicos, resultando na estrutura β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose (N-acetilglucosamina) (Xiao *et al.*, 2016) (Figura 2). A quitina é encontrada em carapaças de crustáceos, exoesqueletos de artrópodes, parede celular de fungos, em algas e em alguns moluscos. Ela é o segundo polissacarídeo mais abundantes na natureza (Souza *et al.*, 2021). A quitosana é um polissacarídeo natural hidrofílico apresentando em sua estrutura grupos aminosse hidroxilas que podem ser modificados quimicamente, aumentando assim a possibilidade de serem metabolizados por algumas enzimas (Khor; Lim, 2003).

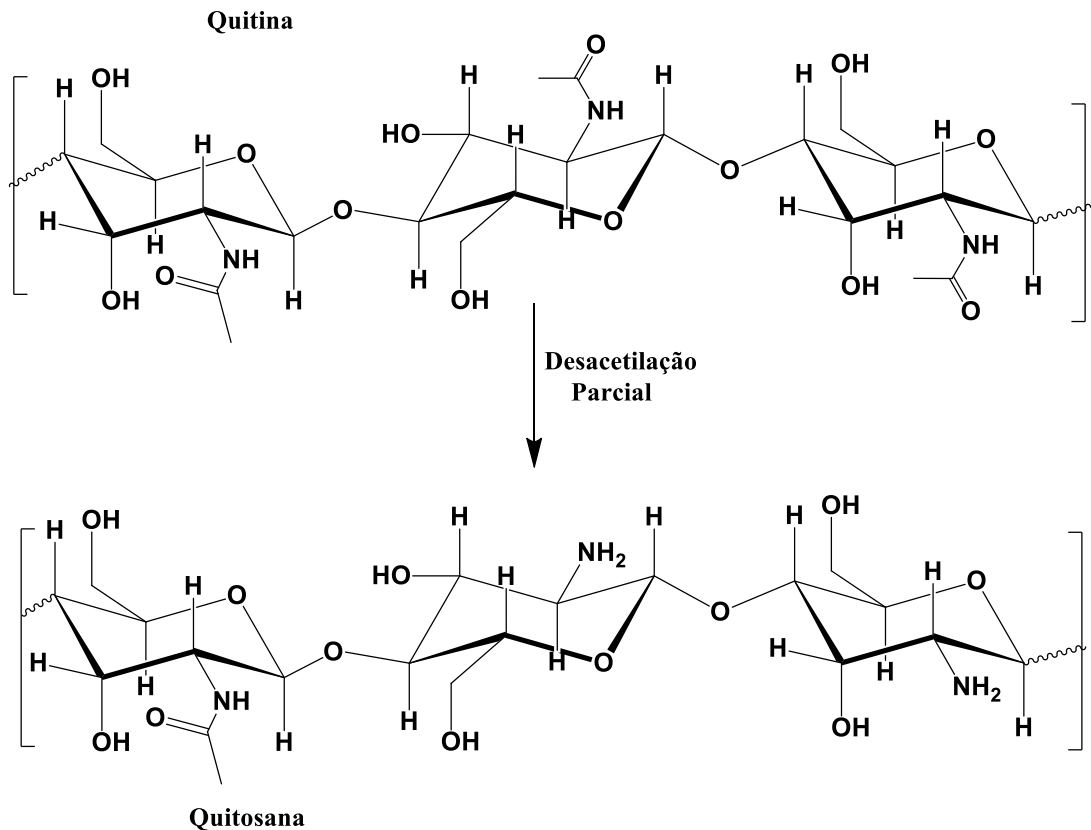
A maior parte da obtenção da quitosana vem da carapaça de crustáceos, no entanto ela é considerada um material seguro para pessoas alérgicas a crustáceos (Waibel *et al.*, 2011). Ela é considerada adequada para aplicações biomédicas e clínicas devido às suas propriedades de alta biocompatibilidade, biodegradabilidade, não antigenicidade e adsorção. Apresentando, ainda, propriedades antimicrobianas e estimulantes do sistema imune, o que favorece o processo de cicatrização de feridas e apresenta um ambiente favorável para adesão e proliferação celular (Liu, Shunli *et al.*, 2018; Sadeghi; Moztaarzadeh; Aghazadeh Mohandesi, 2019).

Os biomateriais à base de quitosana para aplicações na engenharia de tecidos são propostos para diversas finalidades entre elas estão o desenvolvimento de cartilagem (Oryan; Sahvieh, 2017; Reys *et al.*, 2017) cultura de células do tecido ósseo (Pinto *et al.*, 2020) e regeneração periodontal (Chang *et al.*, 2017; Duruel *et al.*, 2017). Nos últimos anos, muitos biomateriais à base de quitosana foram desenvolvidos para aplicações biomédicas, bem documentados em artigos de revisão (Liu *et al.*, 2018; Pellá; Lima-Tenório; Tenório-NETO, 2018; Racine; Texier; Auzély-Velty, 2017).

O grau de desacetilação, uma das mais importantes propriedades químicas desse polissacarídeo, determina a quantidade de grupos amínicos presentes na cadeia polimérica, sendo que, a atribuição do termo quitosana se dá para o material (quitina) com grau de desacetilação igual ou superior a 50%, já que nesse ponto a quitina se torna insolúvel em meio ácido (Rinaudo, 2006). O grau de desacetilação

pode ainda influenciar nas propriedades tais como: cristalinidade, solubilidade, intumescimento, propriedades mecânicas. Afeta também como a viabilidade celular de materiais preparados a partir desse polissacarídeo (Rodrigues *et al.*, 2021).

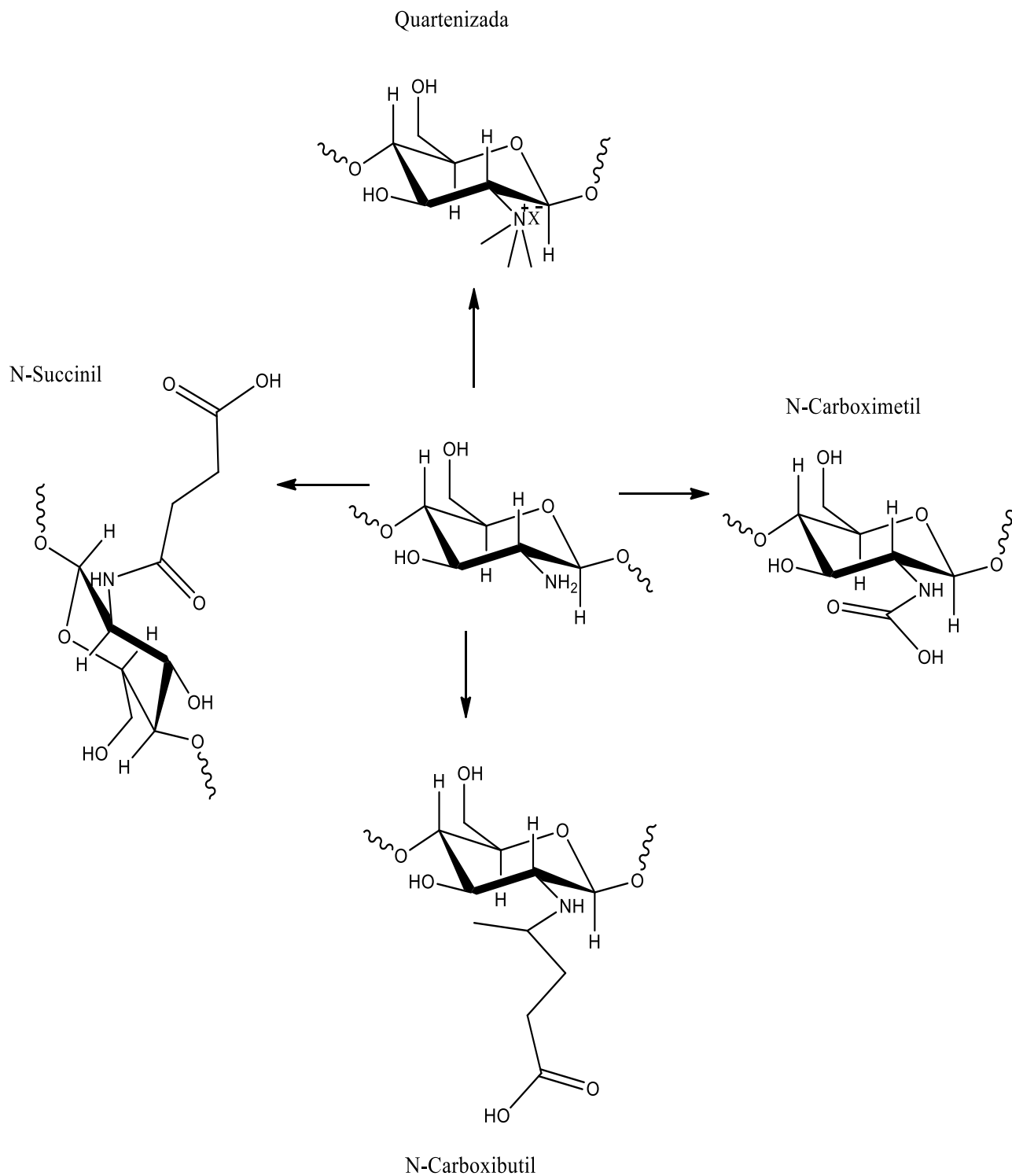
Figura 2 - Estrutura química da quitina e quitosana



Fonte: Baseado em IBRAHIM *et al.*, 2020.

A quitosana é um polissacarídeo praticamente insolúvel em solventes orgânicos e solúvel em soluções aquosas de ácidos diluídos. Sua baixa solubilidade em água é devido à sua estrutura cristalina rígida. Este fator limita sua aplicação na engenharia de tecidos. Neste sentido, várias modificações têm sido empregadas para aumentar sua hidrofiliabilidade, tais como: quaternização (Wang *et al.*, 2019), carboximetilação (Zhang *et al.*, 2020) e succinilação (Lucas de Lima *et al.*, 2020). Na Figura 3 são mostradas as estruturas de algumas modificações da unidade de glucosamina da quitosana.

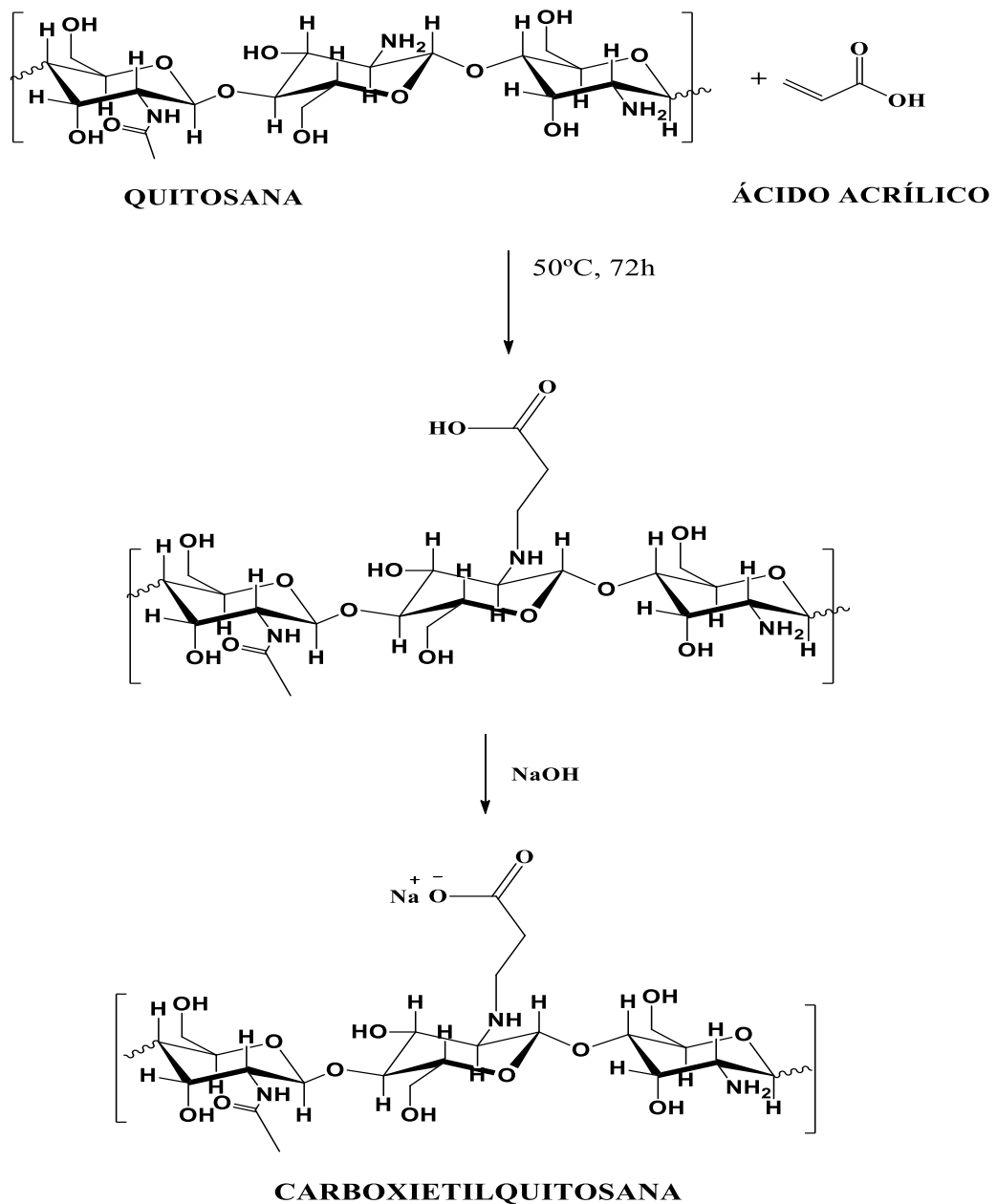
Figura 3 - Estrutura de unidades hidrossolúveis da quitosana



Fonte: elaborada pela autora

Outro método utilizado é a N-carboxietilação. Este método ocorre através da adição de Michael, na qual ocorre um ataque nucleofílico por parte dos elétrons não ligantes (nucleófilo) do nitrogênio da amina ao carbono β do ácido acrílico, seguida da transferência do próton do nucleófilo para o oxigênio. Logo após, ocorre o processo de tautomerização formando assim a carboxietilquitosana. Todo esse processo é realizado utilizando a água como meio de reação (Figura 4) (Ibrahim; Mostafa; Kandile, 2020).

Figura 4 - Síntese da carboxietilquitosana



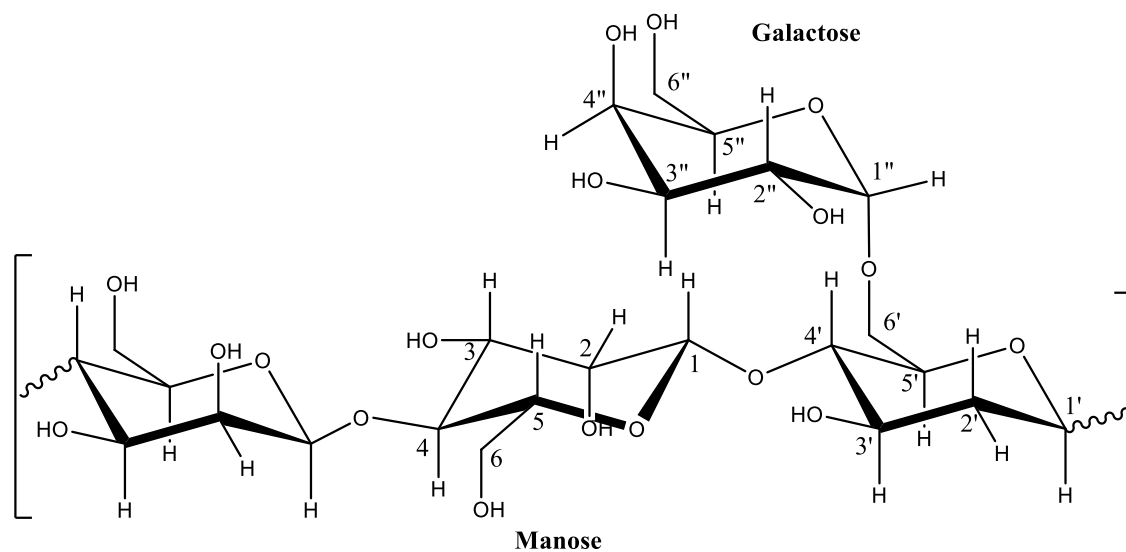
A carboxietilação é um método muito eficiente para ampliar a utilização da quitosana, pois aumenta sua solubilidade em uma ampla faixa de pH (1-14) (Ibrahim; Mostafa; Kandile, 2020; Sashiwa *et al.*, 2003a).

Além da capacidade de solubilizar em diferentes valores de pH, a presença de grupos negativos na quitosana em solução em pH acima de 6,5 (devido a presença de grupos carboxilato), a torna um excelente quelante para substrato de íons metálicos necessários para o desenvolvimento de microorganismos. Os derivados carboxietilados apresentam melhor atividade antimicrobiana que a quitosana não modificada (Ibrahim; Mostafa; Kandile, 2020).

1.3.2 Galactomanana e derivados oxidados

Galactomananas são polissacarídeos de reserva para o desenvolvimento do embrião durante a germinação. Estruturalmente, elas são heteropolissacarídeos ramificados consistindo de uma cadeia de unidades β -D-manopiranosídicas, unidas entre si por ligações (1 \rightarrow 4), que são substituídas por unidades simples α -D-galactopiranosídicas, ligadas à cadeia principal por ligações (1 \rightarrow 6) (Dea; Morrison, 1975) (Figura 5).

Figura 5 - Estrutura química de uma Galactomanana



Fonte: Adaptada de Sierakowski *et al.*, 2000

São observadas diferenças nas razões manose/galactose (Man/Gal) e massa molar de acordo com a origem e espécie da qual foi extraída (Robinson; Ross-murphy; R-morris, 1982). A razão Man/Gal e a forma como os substituintes estão distribuídos ao longo da cadeia principal são fatores que influenciam suas propriedades em solução, principalmente quanto à sua capacidade de solubilização e interação molecular (Andrade *et al.*, 1999). As diferentes propriedades químicas destas gomas fazem delas materiais versáteis usados para muitas aplicações. Mikkonen *et al.*, (2007) vêm estudando o uso de galactomanana para produção de matrizes com maior força de coesão no desenvolvimento de filmes plásticos. Já Lucas de Lima *et al.*, (2020) utilizou-se da galactomanana para produzir hidrogéis injetáveis utilizados na reconstrução de tecidos.

A investigação de novas fontes de galactomananas constituem um assunto de grande importância, tanto do ponto de vista acadêmico como industrial. Países tropicais, como o Brasil, apresentam grande potencial como produtores de recursos renováveis que ainda não foram suficientemente explorados. Nesse cenário surge a *Cassia fistula* (Figura 6), uma leguminosa com flores conhecida vulgarmente como chuva-de-ouro, cana-imperial ou canafístula verdadeira. Ela produz cerca de 166 frutos por ano, em formatos de tubos longos. Esta fruta é imprópria ao consumo direto, no entanto é utilizada, assim como as folhas, cascas, flores e raízes, são utilizados como agente anti-inflamatório, antifúngico e antibacteriano. A espécie é originária da Ásia a qual foi introduzida no Brasil há muitos anos. Hoje se encontra amplamente disseminada em países com clima tropical como Índia, Egito, África (sul e leste), China, México, Ceilão e Sri Lanka. (Brigida; Lúcia; Almeida, 2015; Pal *et al.*, 2021).

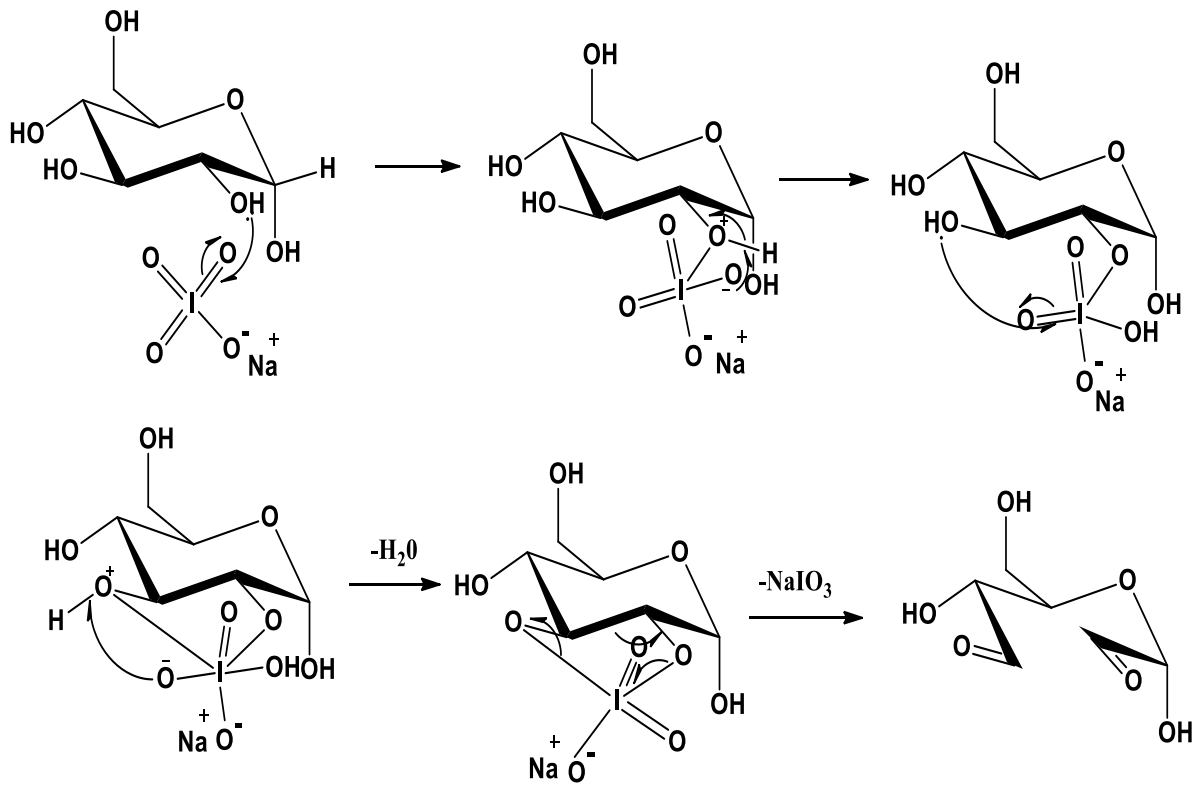
Figura 6 - Árvore, sementes e galactomanana extraída das sementes de *Cassia fistula*



Fonte: elaborada pela autora

As galactomananas podem ser modificadas por oxidação para produzir grupos aldeídos funcionalizados. Elas apresentam grupamentos $-OH$ vicinais, que podem sofrer oxidação na presença do periodato. Na reação o íon, IO_4^- , ataca os dióis vicinais dos carbonos C2 e C3 da galactomanana onde ocorre a clivagem da ligação carbono-carbono, originando grupamentos aldeídicos $C=O$ (Figura 7). Oxidação com periodato de sódio é preferível devido sua seletividade.

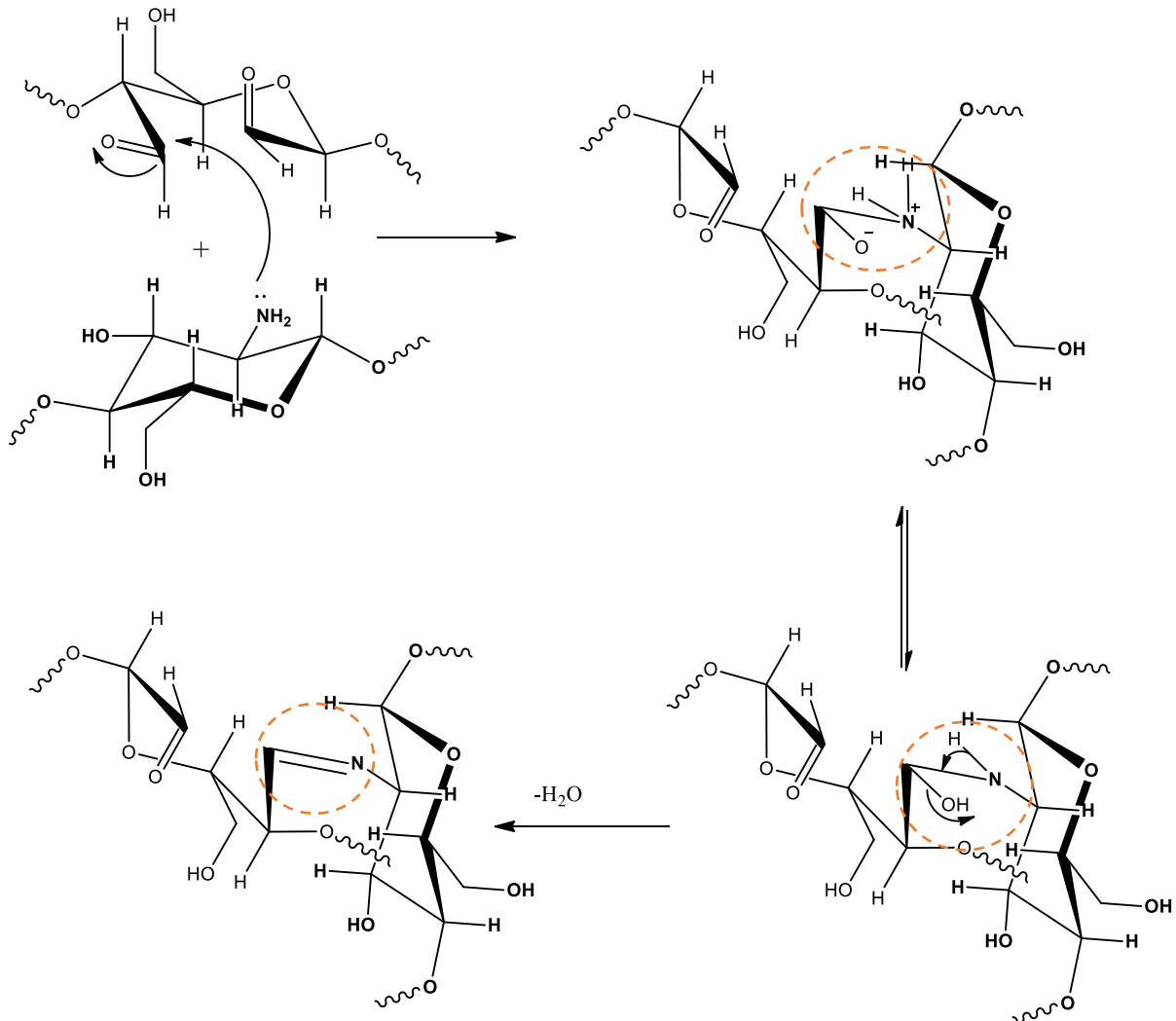
Figura 7 - Estrutura da reação de oxidação de uma unidade monossacarídica com periodato de sódio



Fonte: Baseado em Keshk *et al.*, 2017.

O estudo de derivados aldeídicos funcionalizados é interessante devido a sua reatividade com grupos amina de quitosana e proteínas para formação da imina também conhecidas como Base de Schiff. Essas são obtidas a partir de reações entre grupos carbonílicos e amino. O mecanismo de formação da base de Schiff é mostrado na Figura 8. Dessa forma, é possível obter um hidrogel chamado de rede de cadeia híbrida (do inglês *hybrid polymeric network* (HPN)), hidrogel obtido quando grupos funcionais presentes nos dois polímeros reagem, formando pontos de reticulação, sem a necessidade de haver um agente reticulante atuando. Além disso, são estáveis a temperatura ambiente. A reação pode ser processada em pH de meio fisiológico, apresentando água como subproduto. Essas condições são ideais no preparo de biomateriais para aplicações biomédicas, como os *scaffolds*. Hidrogéis reticulados via base de Schiff são interessantes, pois essas ligações são reversíveis frente à alteração de pH e sua estabilidade decresce com valores de pH baixo, tornando o hidrogel degradável, uma das qualidades indispensáveis dos *scaffolds*.

Figura 8 - Mecanismo de formação de base de Schiff entre uma unidade de manose oxidada e β -1,4 D-glucosamina.



Fonte: elaborada pela autora

Entre os usos dos *scaffolds* está a regeneração da pele. A pele é o maior órgão do corpo humano, atuando como barreira protetora contra agentes nocivos. Portanto, qualquer problema de pele causado por uma lesão ou doença pode levar a danos graves, como hospitalização ou até a morte (Kennedy; Bhaw-Luximon; Jhurry, 2017). Existem alguns substitutos da pele no mercado, tais como: Matriderm®, Dr. Suwelack Skin and Health Care AG, Alemanha; Terudermis®, Terumo Co. Ltd., Japão; Dermagraft®, Organogenesis, Canton, MA entre outros. Porém, esses *scaffolds* têm alto custo e não são totalmente eficazes, por isso é imprescindível a busca por novos

biomateriais que apresentem bons resultados na restauração desses tecidos (Kennedy; Bhaw-Luximon; Jhurry, 2017).

Hidrogéis derivados de proteínas e polissacarídeos são matrizes ideais para engenharia de tecidos, uma vez que possuem componentes semelhantes às matrizes extracelulares e são amplamente utilizados para aplicações biomédicas (Ren *et al.*, 2018; Spicer, 2020). No entanto, até a presente data poucos trabalhos têm abordado a utilização de galactomananas na preparação de *scaffolds* para engenharia de tecido. Dentre os trabalhos publicados podemos citar o uso do galactomanana da *Caesalpinia pulcherrima* utilizada na preparação de *scaffolds* para cicatrização de feridas (de Sousa *et al.*, 2019) e a galactomanana extraída das sementes de *Delonix regia*, utilizada na preparação de filmes e hidrogel injetável para engenharia de tecidos (Lucas de Lima *et al.*, 2020; Siqueira *et al.*, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver hidrogéis com derivados oxidados de galactomanana das sementes de *Cassia fistula* e carboxietilquitosana que apresentem propriedades físico-químicas adequadas para preparação de suportes porosos na engenharia de tecidos

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar a reação de oxidação da galactomanana de *Cassia fistula* com periodato de sódio;
- Analisar o efeito do grau de oxidação da galactomanana na formação dos *scaffolds* e nas suas propriedades;
- Preparar derivados solúveis de quitosana em meio aquoso por reação de carboxietilação com ácido acrílico;
- Avaliar as características físico-químicas dos derivados de quitosana e galactomanana por FTIR, GPC e RMN uni e bidimensional (^{13}C - ^1H);
- Preparar hidrogéis de carboxietilquitosana e os derivados oxidados da GCF;
- Avaliar o tempo de formação dos hidrogéis e a capacidade de intumescimento;
- Estudar a morfologia e estrutura interna dos *scaffolds*;
- Avaliar a biodegradabilidade *in vitro* em meio fisiológico;
- Avaliar a citotoxicidade dos diferentes *scaffolds* obtidos, frente a linhagem de células saudáveis;
- Avaliar o potencial antibacteriano *in vitro* dos *scaffolds*.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais

As sementes de *Cassia fistula* foram coletadas em dezembro de 2017 na Universidade Federal do Ceará, região de Fortaleza, Ceará, Brasil (SISGEN A94F27D). A quitosana foi adquirida da empresa Polymar; o ácido acrílico da empresa VETEC e o periodato de sódio da empresa Synth. O meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) de baixa glicose, tripsina e linha celular de fibroblastos de camundongo L929 foram obtidos da Sigma-Ildrich. O bicarbonato de sódio (NaHCO_3) foi adquirido da Fisher Scientific; soro fetal bovino (FBS) e antibiótico-antimicótico da GibcoTM. InvitrogenTM foi o fornecedor de Calcein-AM. Foram utilizadas microplacas de 96 poços de poliestireno preto Corning® com fundo plano transparente.

3.2 Extração da galactomanana de *Cassia fistula*

As sementes foram separadas das vagens e o isolamento e purificação da galactomanana das sementes foram realizados conforme descrito por Cunha *et al.*, (2009). Resumidamente, 50 g de sementes foram colocadas em água sob aquecimento (100 °C) durante 20 minutos em agitação magnética, para inativação enzimática e permaneceram em água por um período de 24 horas em temperatura ambiente (~ 29 °C) sem agitação. Os endospermas foram separados manualmente, e colocados em água destilada sob agitação por 2 horas a 75 °C. A mistura foi triturada em liquidificador. Em seguida, o sobrenadante foi precipitado em álcool etílico na razão de 1:3 (volume de solução de sobrenadante/volume de álcool). A galactomanana obtida foi recolhida em funil de placa sinterizada nº 3, lavada com álcool etílico e acetona P. A. e em seguida seca com jato de ar quente.

3.3 Oxidação da galactomanana com periodato

A galactomanana foi modificada pela reação de oxidação segundo o método descrito por Leite *et al.*, (2017). Para a reação de oxidação, 1,0 g de GCF (correspondendo a $6,17 \times 10^{-3}$ mol de unidades glicosídicas) foi dissolvido em 200 mL

de água destilada sob agitação por 24 horas. Após a completa dissolução, 0,13; 0,26; 0,66 e 1,04 g de NaIO_4 foram adicionados para obter os derivados de GCF oxidados com graus de oxidação de 10, 20, 50 e 80% (daqui em diante designados como CF10, CF20, CF50 e CF80, respectivamente). A mistura foi deixada no escuro, para evitar a decomposição fotoinduzida do íon periodato, e mantida à temperatura ambiente ($\sim 29^\circ\text{C}$) durante 24 horas. Adicionou-se etilenoglicol (densidade relativa 1,115 g/mL) numa quantidade estequiométrica em relação a NaIO_4 para parar a reação. As soluções dos derivados oxidados foram dialisadas contra água ultrapura em membrana de celulose (MWCO, 14 kDa, Spectrum Lab, EUA) até que a condutividade da água de diálise fosse igual à da água ultrapura. Após liofilização, o derivado oxidado foi recuperado.

3.3.1 Determinação do grau de oxidação

O grau de oxidação foi determinado pelo método da titulação do cloridrato de hidroxilamina descrito por ZHAO, H., HEINDEL, 1991.

O grau de oxidação foi calculado através da Equação 1.

$$\text{Grau de oxidação (\%)} = \frac{(\text{CNaOH} \times \text{VNaOH}) \times 162}{2\text{mp}} \times 100 \quad (1)$$

onde C é a concentração em mol L^{-1} e V o volume em litros, de NaOH, mp corresponde a massa do polissacarídeo em gramas e 162 é a massa molar de unidade monossacarídica da manose, em g mol^{-1} .

3.4 Purificação da Quitosana

A quitosana foi purificada de acordo com a metodologia descrita por Benamer, 2012, com algumas modificações. Dissolveram-se 10,0 g de quitosana em 1 L de ácido acético a 2% (v/v) e permaneceu sob agitação durante 24 horas para dissolução completa. A solução foi então centrifugada (15 min, 6000 rpm), filtrada através do funil de placa sinterizada N° 3 e depois aquecida a 100°C por 15 minutos para desnaturar e precipitar as proteínas. A mistura foi novamente centrifugada (15 minutos, 6000 rpm). O sobrenadante foi removido e filtrado através do funil de placa sinterizada n° 3. O pH da solução foi então ajustado para 10 com NaOH 1 mol L^{-1} , a fim de precipitar a quitosana da fase aquosa. O precipitado de quitosana foi

recuperado por centrifugação e lavado com água deionizada para remover o excesso de NaOH até os valores de pH e condutividade atingirem os valores de água pura. A quitosana foi lavada com acetona e seca com jato de ar quente.

3.5 Carboxietilação da Quitosana

A síntese da carboxietilquitosana com maior grau de modificação (CEQA) foi realizada de acordo com o método previamente descrito por Sashiwa *et al.*, (2003). Resumidamente, em um balão volumétrico contendo 50 mL de água destilada foram adicionados 1,46 mL de ácido acrílico e 1,0 g de quitosana. O sistema foi mantido sob agitação a 50 °C por um período de 72 horas. Após esse período, o pH do sistema reacional foi ajustado para 10 com uma solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹ para converter o ácido acrílico em seu sal sódico. A mistura foi então precipitada em etanol PA na razão de 2:1 (volume álcool: volume da reação). O precipitado foi lavado com álcool e acetona e seco em estufa a 60 °C. O mesmo procedimento foi realizado com 0,36 mL de ácido acrílico com o intuito de obter a carboxietilquitosana com um menor grau de substituição (CEQB).

3.6 Caracterização dos materiais utilizados

3.6.1 Análises de distribuição da massa molar por cromatografia de permeação em gel (GPC) da GCF e seus derivados

As amostras de galactomanana e seus derivados foram dissolvidas em água destilada a 0,1% m/v e filtradas através de membrana MILLIPORE de 0,45 µm. A distribuição da massa molar foi determinada por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), usando Cromatógrafo Shimadzu (LC-20AD) acoplado a um detector de índice de refração (RID-10^a). Uma pré-coluna PolySepGFC-P fenomenex (35 mm x 7,80 mm) e uma coluna PolySepGFC-P linear (300 mm x 7,80 mm) com fase móvel de NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹, à temperatura ambiente e 1,0 mL de fluxo/min. Foram utilizadas curvas padrões para a determinação da massa molar foi construída usando padrões de pululana (Shodex Denko®) com massas molares na faixa de 5,9 x 10³ a 7,8 x 10⁵ g mol⁻¹.

3.6.2 **Determinação da viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica da Quitosana**

A viscosidade intrínseca e a massa molar viscosimétrica da quitosana foram medidas utilizando o viscosímetro capilar (CANNON INSTRUMENTS modelo 1 I-71 Ubbelohde) a 25 °C em um banho de água com temperatura controlada. As soluções de quitosana foram preparadas nas concentrações de 0,1% (m/v) em solução 0,25 mol L⁻¹ de ácido acético/0,25 mol L⁻¹ de acetato de sódio (Kasaai, 2007). Para a determinação da viscosidade intrínseca, foram realizadas cinco diluições. Para cada amostra de quitosana, um mínimo de três medições de tempo de fluxo foram realizadas. A concentração real da solução após a filtração foi obtida utilizando-se do grau de pureza da quitosana através da análise termogravimétrica. A determinação da viscosidade intrínseca, $[\eta]$, foi obtida através da extrapolação dos dados de viscosidade à diluição infinita, de acordo com a Equação de Huggins (Equação 2).

$$\eta_{sp}/c = [\eta] + k_H[\eta]^2 c \quad (2)$$

onde, η_{sp} é a viscosidade específica, η_{sp}/c é a viscosidade reduzida, k_H é o coeficiente de Huggins e C é a concentração do polímero.

Já a massa molar viscosimétrica foi calculada utilizando-se da equação (3) de Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = K \cdot M_v^a \quad (3)$$

Em que:

$[\eta]$ é a viscosidade intrínseca;

M_v é a massa molar viscosimétrica média;

K e a são constantes viscosimétricas com valores de $1,6 \times 10^6$ dL g⁻¹ e 0,79 respectivamente. Essas constantes não dependem da massa molar, no entanto são dependentes do solvente, da temperatura e da estrutura do polímero (Kassai, 2007).

3.6.3 Determinação do grau de desacetilação da Quitosana e grau de substituição da carboxietilquitosana

O grau de desacetilação (GD) da quitosana foi determinado tanto por análise elementar quanto pela análise de ressonância magnética nuclear de prótons ^1H (Huang *et al.*, 2015).

O grau de desacetilação (GD) da amostra de quitosana foi determinado através da Equação 4.

$$\text{GD}(\%) = 1 - \left(\frac{\frac{\text{C}}{\text{N}} - 5,14}{6,8 - 5,14} \right) \times 100 \quad (4)$$

Em que C/N representa a relação entre carbono e nitrogênio da quitosana obtida através da análise elementar, 6,8 é a razão entre C/N considerando a quitosana 100% acetilada e 5,14 é a razão entre C/N considerando a quitosana 100% desacetilada.

Pela técnica de espectroscopia ^1H -RMN o grau de acetilação (GA), desacetilação (GD) e substituição das amostras carboxietiladas (GS) foram calculadas através da razão entre as áreas dos prótons metílicos referentes as unidades acetiladas (A_{CH_3}) e do próton ligado ao carbono 2 do anel de glicosamina (A_{H_2}) de acordo com as seguintes Equações (5, 6 e 7) (Huang *et al.*, 2016; Signini; Campana Filho, 2001).

$$\text{GA}(\%) = \frac{A_{\text{CH}_3}}{3A_{\text{H}_2}} \times 100 \quad (5)$$

$$\text{GD}(\%) = (1 - \text{GA}) \quad (6)$$

$$\text{GS} = (1 - \text{GD}) \times \frac{3A_{\text{H}_2}}{2A_{\text{CH}_3}} \quad (7)$$

3.6.4 Avaliação da solubilidade em diferentes pH da carboxietilquitosana em meio aquoso

A solubilidade da carboxietilquitosana em diferentes valores de pH foi determinada por medição da turbidez seguindo método descrito por Ding *et al.*, (2012). Foi preparada uma solução aquosa de CEQB e QP (2 mg mL⁻¹) ajustado para o valor de pH 1,5; Solução de NaOH (1,0 mol L⁻¹) foi adicionada para ajustar o pH. Avaliou-se a solubilidade das amostras pela transmitância de radiação visível em diferentes valores de pH em um espectrofotômetro SHIMADZU UV-1800 a 600 nm. Foi realizado ainda o teste de solubilidade em diferentes pH solubilizando a quitosana e seus derivados carboxietilados em soluções de HCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 1); água destilada (pH 5,5); Tampão PBS (0,1 mol L⁻¹; pH 7,4) simulando o meio fisiológico e NaOH 0,1 mol L⁻¹ (pH 14) a fim de ver o perfil macroscópico das soluções. As soluções foram preparadas nas concentrações de 2% (m/v).

3.6.5 Análise Elementar

Para a microanálise elementar das amostras foi utilizado o Analisador Elementar - Perkin Elmer 2400 séries II no modo C, H e N. O gás de arraste utilizado foi hélio de alta pureza. Foram utilizadas 2 mg de amostras e a análise foi realizada em duplicada. Para o cálculo do percentual de nitrogênio na amostra foi utilizada a equação 8

$$\%N(GCF) = \frac{\%N}{14,01} \times 162 \quad (8)$$

Onde 14,01 g mol⁻¹ é massa molar do nitrogênio e 162 g mol⁻¹ é a massa molar no monômero da GCF

3.6.6 Ressonância Magnética Nuclear

Para obter os espectros de RMN, a galactomanana e seus derivados oxidados (10 mg) foram dissolvidos em água deuterada (600 µL). Já as amostras de quitosana e seus derivados (10 mg) foram dissolvidos em uma mistura de água deuterada (600 µL) e ácido clorídrico deuterado (20 µL). Obtiveram-se espectros de ¹H RMN e ¹³C RMN a 70 °C em um espectrômetro BRUKER modelo AVANCE-

DRX500. O 2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato (DSS) foi adicionado às amostras para calibração do espectro de deslocamento químico (δ) zero.

3.6.7 Análise por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram secas à temperatura ambiente e combinadas com brometo de potássio (KBr), produzindo pastilhas. O espectro de infravermelho das amostras foi registrado em um espectrômetro FTIR - 8500 (Shimadzu) no número de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} .

3.6.8 Análise da citotoxicidade da GCF

As células foram cultivadas em microplacas de 96 poços e as monocamadas foram incubadas por 72 horas a 37 °C e 5% de CO_2 com DMEM contendo 5% de soro fetal bovino (FBS), penicilina G (100 IU/ml), enrofloxacina (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e anfotericina B (1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com diluições em série dos compostos em diferentes concentrações, com variação de 1,9 a 1000 $\mu\text{g/ml}$. A toxicidade *in vitro* do GCF, que foi esterilizado por filtração através de membranas de PVDF (tamanho de poro 0,22 μm), foi determinada de acordo com Denizot & Lang, (1986), quantificando as células viáveis usando 3-[4,5-dimetil-tiazol-Brometo de 2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que é convertido em formazano púrpura pelas desidrogenases mitocondriais. A concentração citotóxica de cinquenta por cento (CC50) foi definida como a concentração de polissacarídeo que poderia reduzir em 50% o número de células viáveis, quando comparada com um controle sem polissacarídeo. Os experimentos foram estatisticamente expressos como média + desvio padrão e analisados pelo Teste t de Student com $p < 0,01$ (Bolton, 1990). As variáveis que ultrapassaram os limites superiores de quantificação, foram consideradas estatisticamente significativas.

3.6.9 Análise da citotoxicidade dos derivados CEQA, CEQB, CF20 e CF50

O teste do MTT se baseia na capacidade das enzimas oxidorreductase celulares dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para reduzir o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT), de cor amarela, para formar um composto de cor púrpura (Kueete; Karaosmanoğlu; Sivas, 2017), o que permite desta forma a quantificação indireta da porcentagem de células vivas.

As células L929 foram plaqueadas nas concentrações de $0,1 \times 10^6$ cél mL⁻¹ em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com as amostras em concentração única de 100 mg mL⁻¹. As placas foram incubadas por 69 h em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Decorrido o tempo determinado, o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (0,5 mg mL⁻¹), e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em leitor de microplaca (Molecular Devices, Spectramax 190) sob o comprimento de onda de 595 nm.

Os valores foram analisados pela média ± desvio padrão da média (DPM). Os valores das absorbâncias foram transformados em viabilidade celular a partir dos valores de absorbância previamente normalizados com base na média da absorbância do controle negativo utilizando o programa GraphPadPrism versão 7.0. As análises foram realizadas no Laboratório de Cultura de Células do Delta (LCCDelta) da Universidade Federal do Delta do Parnaíba.

3.7 Síntese dos hidrogéis e scaffolds

Dispersões aquosas de CF10, CF20, CF50, CEQA e CEQB na concentração de 2% (m/v) foram preparadas e mantidas sob agitação por 24 horas a 50 °C. Logo após as soluções foram mantidas a 37 °C por 2 horas, foram misturados por pipetagem de 1 mL de CEQ sobre 1 mL do derivado oxidado (CEQA/CF10; CEQA/CF20; CEQA/CF50; CEQB/CF10; CEQB/CF20; CEQB/CF50) num frasco cilíndrico de 2,5 cm de diâmetro. Os frascos foram deixados à temperatura ambiente durante 24 horas para a geleificação completa, depois mantidos a -80 °C em um congelador Nuair Ultra durante por 24 horas. Finalmente, a mistura foi liofilizada.

3.7.1 Caracterização dos scaffolds

3.7.1.1 Tempo de geleificação

O tempo de geleificação das amostras de hidrogéis foi determinado pelo método da barra magnética como descrito por Balakrishnan, Joshi, Jayakrishnan, & Banerjee, (2014) com pequenas alterações. Foram misturadas 150 μL de uma solução aquosa a 2% de CEQ com 150 μL de solução aquosa do derivado oxidado a 37 °C. As soluções foram agitadas utilizando-se de uma barra magnética com revestimento de teflon de 10 mm de comprimento e 5 mm de diâmetro em um recipiente de vidro de 10 mL (20 mm de diâmetro). O tempo requerido pela barra para formar um glóbulo foi tomado como o tempo de geleificação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

O tempo de geleificação foi determinado ainda pelo método da inversão de tubo seguindo a metodologia descrita por Giovagnoli, Tsai, & Deluca, (2010). Em um tubo de ensaio foram misturados 1 mL de uma solução aquosa a 2% de CEQ com 1 mL de solução aquosa do derivado oxidado, mantidas em um banho termostaticado à temperatura de 37 °C. A cada 5 segundos o tubo de ensaio era inclinado para observar o estado da amostra. O tempo necessário para geleificação foi determinado pela ausência de fluidez da solução presente no tubo, caracterizando assim a formação do hidrogel.

3.7.1.2 Análises Reológicas

As medidas reológicas foram realizadas em um reômetro da TA Instruments Rheometer advanced, modelo AR-550. Para as análises de formação dos hidrogéis foram realizadas misturas homogêneas, que continham 150 μL de solução CEQ (2% mv) e 150 μL de solução do derivado oxidado (2% mv), o módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') dos hidrogéis foram medidos utilizando-se geometria de placas cone-placa com diâmetro de 40 mm, ângulo de 1°, gap 28 μm a 37 °C. Foram realizados testes de varredura de tempo com diferentes temperaturas, concentrações, razões de volume e graus de oxidação. Os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') foram monitorados em função do tempo a uma frequência de 1 Hz e uma tensão de cisalhamento de 5 Pa.

As medidas reológicas dos hidrogéis pré-formados, por um período de 24h em formatos cilíndricos com o diâmetro de 15 mm e espessura de 4 mm, foram realizadas em reômetro com geometria de placas paralelas (20 mm de diâmetro) operando em modo oscilatório. Um teste dinâmico de varredura de frequência (1 a 10 Pa) e tensão (0,1 a 10 Hz) foram realizados a fim de determinar a região viscoelástica linear de cada hidrogel. O módulo de armazenamento dos hidrogéis foi monitorado a uma frequência e tensão na região viscoelástica linear por 30 minutos a 37 °C. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.7.1.3 Análises de intumescimento

Estudos de intumescimento dos *scaffolds* CEQA/CF10; CEQA/CF20; CEQA/CF50; CEQB/CF10; CEQB/CF20 e CEQB/CF50 foram realizados em solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,1 mol L⁻¹; pH 7,4 a 26±2 °C) sob agitação pelo método gravimétrico. Foi realizada a medida da massa dos *scaffolds* secos, em seguida as amostras foram imersas em 35 mL de solução salina. As medições dos *scaffolds* intumescidos foram realizadas a cada 10 minutos por um período de 2 horas. A cada período a amostra foi removida, limpa com papel absorvente para remover o excesso de solvente e pesada imediatamente. O grau de intumescimento dos *scaffolds* em PBS foi calculada usando a Equação (9):

$$\text{intumescimento} = \frac{m_f - m_i}{m_i} \quad (9)$$

em que m_f é a massa final (em gramas) e m_i a massa inicial (em gramas) dos *scaffolds*.

3.7.1.4 Porosidade dos *scaffolds*

A porosidade foi calculada pelo método de infiltração do etanol (Sivashankari e Prabakaran, 2020). O etanol absoluto foi escolhido, pois penetra facilmente através dos poros dos *scaffold* sem modificá-los. Os volumes dos géis secos (V) foram obtidos a partir dos dados de diâmetro e altura medidos com paquímetro digital de 0 a 150 mm – Digital marca COSA. Os géis secos foram pesados

(m_i) e em seguida imersos em etanol absoluto e centrifugados por 10 minutos a 1200 rpm para facilitar a penetração do etanol através de toda a amostra. Após a centrifugação, o excesso de etanol da superfície das amostras foi seco com papel de filtro obtendo-se assim sua massa após a imersão (m_f). As porosidades então foram calculadas a partir da Equação 10:

$$\text{Porosidade (\%)} = \frac{m_f - m_i}{\rho \times V} \times 100 \quad (10)$$

em que m_i e m_f são as massas das amostras antes e depois da imersão em etanol, respectivamente; ρ é a densidade do etanol absoluto ($0,789 \text{ g cm}^{-3}$) e V é o volume dos *scaffolds* secos.

3.7.1.5 *Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A estrutura porosa dos *scaffolds* foi examinada através de MEV. Os hidrogéis foram preparados em seringas de 3 mL, deixados em repouso por 24 horas e congelados em um ultra freezer $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas, em seguida foram liofilizados, os *scaffolds* liofilizados foram colocados em nitrogênio líquido logo depois fracionados. Os fragmentos foram recobertos com ouro e a morfologia dos *scaffolds* foi avaliada com o equipamento Quanta-FEG Fei 450. As análises foram realizadas pela Central Analítica da Universidade Federal do Ceará.

3.7.1.6 *Tamanho de poros*

O tamanho dos poros foi medido através das imagens obtidas pela análise de microscopia eletrônica de varredura. As imagens foram analisadas através do software imageJ e as dimensões foram obtidos a partir da média de 200 medidas.

3.7.1.7 *Análises Mecânicas*

As medidas de tensão-deformação elástica foram analisadas em DMA25 METRAVIB. Os *scaffolds* de forma cilíndricas (diâmetro médio = 9 mm, altura = 18 mm) foram preparados em seringas de 3 mL o bocal da mesma foi removido e as soluções (1,5 mL do derivado oxidado (2% mv) + 1,5 mL de CEQ (2% mv)) foram

pipetadas nela e homogeneizadas. Os hidrogéis foram deixados em repouso por 24 horas para garantir o processo completo de reticulação. As amostras foram congeladas em ultra freezer em seguida liofilizadas e submersas em tampão PBS (0,1 mol L⁻¹; pH 7,4) 24 horas antes dos testes. As amostras de teste foram submetidas a uma compressão uniaxial até 5% de deformação (0,02 mm/s) a partir da altura inicial. O módulo de compressão foi calculado a partir da inclinação da reta na região linear da curva tensão/deformação. Os ensaios foram realizados em triplicata a uma temperatura constante (37 °C). As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Biomassas da EMBRAPA.

3.7.1.8 Teste de Degradação

A análise de degradação seguiu a metodologia descrita por BALAKRISHNAN *et al.*, (2017). O teste de degradação dos *scaffolds* foi efetuado em relação à perda de massa em tampão PBS (0,1 mol L⁻¹; pH 7,4; T=37 °C) em uma incubadora sob agitação constante de 100 rpm por um período de 28 dias. A massa inicial dos *scaffolds* foi determinado (m_i), em intervalos de tempo específicos (1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias), Ao fim de cada período, os hidrogéis foram removidos, imersos em água destilada para retirar o excesso de salinidade até a condutância do meio alcançasse o valor de 2 μ S cm, liofilizados e pesados (m_f). A razão de perda de massa foi determinada de acordo com Equação (11):

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{m_i - m_f}{m_f} \times 100 \quad (11)$$

em que:

m_i = a massa inicial dos *scaffolds*;

m_f = a massa final dos *scaffolds* liofilizados após o processo de degradação.

3.7.1.9 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas forma realizadas para analisar a estabilidade térmica dos materiais. As análises de TGA foram realizadas usando um analisador termogravimétrico (Q50 da TA Instruments). As análises foram feitas de 20

a 700 °C, com aumento linear de 10 °C min⁻¹, sob atmosfera de ar sintético com um fluxo de 60 mL min⁻¹ em amostras de aproximadamente 10 mg.

3.7.1.10 *Análise da toxicidade in vitro da GCF*

As células foram cultivadas em microplacas de 96 poços e as monocamadas foram incubadas por 72 horas a 37 °C e 5% de CO₂ com DMEM contendo 5 % de soro fetal bovino (FBS), penicilina G (100 IU mL⁻¹), enrofloxacin (10 µg mL⁻¹) e anfotericina B (1,25 µg mL⁻¹) com diluições em série de 2 vezes dos compostos em diferentes concentrações, variando de 1,9 a 1000 µg mL⁻¹. A toxicidade *in vitro* da GCF, que foi esterilizado por filtração através de membranas de PVDF (tamanho de poro 0,22 µm), foi determinada de acordo com Denizot & Lang, (1986), quantificando as células viáveis usando brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), que é convertido em formazano púrpura pelas desidrogenases mitocondriais. A concentração citotóxica de cinquenta por cento (CC50) foi definida como a concentração de polissacarídeo que poderia reduzir em 50% o número de células viáveis, quando comparada com um controle sem polissacarídeo. Os experimentos foram estatisticamente expressos como média + desvio padrão e analisados pelo teste t de Student com P < 0,01 (Bolton, 1990). As variáveis que ultrapassaram o limite superior de quantificação foram consideradas estatisticamente significativas. A análise foi realizada pelo Laboratório de Microbiologia Yasuyoshi Hayashi, do Departamento de Patologia Básica, UFPR, Curitiba, PR, Brazil

3.7.1.11 *Cultura de células in vitro e semeadura nos scaffolds*

Para os testes *in vitro*, a linha celular fibroblástica murina L929 foi escolhida e mantida em um ambiente umidificado a 5% de CO₂ a 37 °C em meio de cultura DMEM de baixa glicose suplementado com 10% FBS, 1% antibiótico-antimicótico (penicilina - 10.000 unidades. mL⁻¹, estreptomicina - 10.000 µg mL⁻¹, anfotericina B - 25 µg mL⁻¹) e bicarbonato de sódio (3,7 gL⁻¹) até a confluência desejada. Antes da semeadura das células, os suportes com formato cilíndrico foram imersos em etanol 70% por 2 horas, 3 vezes lavados com PBS para garantir condições estéreis antes da

submersão com meio de cultura de células em placas de 24 poços para incubação durante a noite. No dia seguinte, as células foram separadas dos frascos de cultura de tecidos com solução de tripsina após uma lavagem com PBS. Foi adicionado meio de cultura e a suspensão de células foi centrifugada durante 5 min a 300 g. Cada *scaffold* foi semeado com 10^4 células em 20 μL com uma agulha 21G. Os *scaffolds* semeados foram incubados a 37 °C com 5% de CO_2 e apenas suplementados com meio celular quatro horas depois. A avaliação da atividade metabólica celular foi realizada em 1, 4, 7, 14 e 21 dias de incubação. A análise foi realizada pelo CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro

3.7.1.12 Avaliação da citocompatibilidade dos scaffolds

A avaliação do efeito citotóxico dos materiais desenvolvidos (CEQA/CF20, CEQB/CF20, CEQA/CF50 e CEQB/CF50) foi obtida com o ensaio de redução da resazurina. O metabolismo celular regular reduz o meio celular. Portanto, quando o composto de resazurina (incolor, não fluorescente) é misturado ao meio celular, ele é convertido em resofurina devido à atividade metabólica celular, fornecendo um sinal colorimétrico e fluorescente que pode ser detectado. Na presença de células viáveis, uma mudança de cor ou fluorescência ocorrerá indicando a proliferação celular. Em intervalos pré-determinados, a solução Alamar foi diluída em meio de cultura celular (1:10) e adicionada a cada esponja semeada (6 repetições de 4 condições, 3 experimentos independentes) em placas de 48 poços por 6 horas a 37 °C, 5% de CO_2 . Em seguida, 100 μL de cada meio colorido foram transferidos em triplicata para uma placa preta de 96 poços com fundo transparente para leitura de fluorescência (excitação: 540 ± 35 , emissão: 600 ± 40 nm) usando SynergyTM HTX. Exceto para o último ponto de tempo, os *scaffolds* foram lavados com PBS antes de retornar às condições de cultura anteriores. Após 21 dias em cultura, os materiais semeados foram corados por 30 min a 37 °C com 1 mg mL^{-1} de uma solução de PBS com calceína-AM (1:500), iodeto de propídio (1:1000) e Hoechst (1:1000) para permitir a visualização do núcleo vivo/morto/celular. A observação e aquisição de imagens de fatias finas de cada esponja marcada com fluorescência foi realizada usando Zeiss Axio Imager 2 (50x) e Zeiss ZEN 2.6. software, também usado para análise. O GraphPad Prism 8 foi usado para apresentar e analisar os dados da atividade metabólica, embora nenhuma significância estatística tenha sido detectada (ANOVA

de duas vias, * $p < 0,05$). A análise foi realizada pelo CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro

3.7.1.13 Avaliação do potencial antibacteriano *in vitro*

As linhagens bacterianas utilizadas nos testes são provenientes da coleção de culturas estoques, armazenadas em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, mantidas no Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – BIOTEC da Universidade Federal do Delta do Parnaíba.

As amostras dos polímeros em pó foram diluídas em água estéril a uma concentração de 8 mg/mL para realização do teste de concentração inibitória mínima (CIM). Os *scaffolds* foram testados após exposição à luz UV por 30 minutos em cabine de segurança biológica nível II, para esterilização dos mesmos.

A análise do potencial antibacteriano pelo método de microdiluição em caldo é o teste recomendado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015) para obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou seja, a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano visível. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços, em triplicata e em cabine de segurança biológica nível II.

Para a realização dos experimentos, as cepa foram previamente semeadas em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (Kasvi), sendo essas, incubadas em estufa bacteriológica por 18-24 horas a uma temperatura de $35\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, em condições aeróbicas.

Após esse tempo, colônias isoladas foram coletadas com alça bacteriológica estéril e suspensas em solução salina estéril [NaCl 0,85% (p/v)], até que se obtivesse uma absorbância variando entre 0,08 e 0,13 sob um comprimento de onda de 625 nm, o que corresponde a 0,5 na escala de McFarland (aproximadamente $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias mL^{-1} – UFC mL^{-1}). A partir dessa suspensão as bactérias foram inoculadas em caldo Mueller-Hinton (Difco™) para realização de inóculo padronizado (concentração de 5×10^5 UFC mL^{-1}). Em seguida, realizou-se o teste para determinação da CIM dos materiais, onde as bactérias supracitadas foram expostas a uma diluição seriada de razão 2 dos polímeros testados (CEQA, CEQB e CF20) com concentrações variando de 4 a 0,125 mg mL^{-1} por 24 horas a $35\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, em condições aeróbicas. Concomitantes ao teste

foram incubados os controles de esterilidade do meio e das substâncias e o controle de crescimento das bactérias.

A avaliação do potencial antibacteriano dos *scaffolds* foi realizada por meio do ensaio de contagem de unidades formadoras de colônias bacterianas –UFC (Li, Yuanhong *et al.*, 2020). Brevemente, os *scaffolds* (CEQA/CF20 e CEQB/CF20) foram imersos em 1mL de suspensão bacteriana (5×10^5 UFC mL⁻¹) e incubados rotineiramente a 35 ± 2 °C. 1 mL de suspensão bacteriana sem *scaffolds* serviu como controle. Após o período de incubação (24 horas), a suspensão bacteriana foi diluída em solução salina estéril [NaCl 0,85% (m/v)] e então inoculada em placas de ágar Mueller-Hinton. As placas inoculadas foram incubadas e, após 24 horas, as UFC foram contadas. A atividade de inibição foi apresentada como a perda de viabilidade em relação ao controle, de acordo com a equação: perda de viabilidade = $(\text{UFC}_{\text{controle}} - \text{UFC}_{\text{amostra}}/\text{UFC}_{\text{controle}}) \times 100$. A atividade antibacteriana absoluta foi apresentada como a proliferação de bactérias em comparação com as UFC em 0 hora (taxa de proliferação = $\text{UFC}_{\text{amostra}}/\text{UFC}_{0\text{h}}$). Os valores são apresentados como a média \pm erro padrão da média. Para analisar a diferença significativa entre as médias de perda de viabilidade (%) utilizou-se o teste T, enquanto a significância da taxa de proliferação das bactérias tratadas em relação ao controle (bactérias não tratadas) foi avaliada por meio da análise de variância, ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnet. Foi admitido um $p < 0,05$ para dados estatisticamente significativos. O programa GraphPad Prism 8.0.1 foi utilizado para as análises estatísticas. Os ensaios foram realizados pelo Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – BIOTEC da Universidade Federal do Delta do Parnaíba – PiauÍ – Brasil.

3.7.1.14 *Análise do efeito antibacteriano do scaffold CEQB/CF20 por microscopia de força atômica (MFA)*

A avaliação do efeito antibacteriano do *scaffold* foi realizada por meio do contato direto com o meio inoculado com *Staphylococcus epidermidis* (Li, Yuanhong *et al.*, 2020). Brevemente, o *scaffold* (CEQB/CF20) foi imerso em 1mL de suspensão bacteriana (5×10^5 UFC mL⁻¹) e incubado rotineiramente a 35 ± 2 °C. 1 mL de suspensão bacteriana sem o *scaffold* serviu como controle. Após o período de incubação (24 horas), procedimentos semelhantes aos de Araujo *et al.*, (2015) foram utilizados para a realização da análise.

O microscópio utilizado para a análise foi o TT-AFM (AFM Workshop - EUA), no modo de contato intermitente, usando pontas TAP300-G10 (TED PELLA, INC.) com uma frequência de ressonância de 237,21 kHz. As imagens obtidas foram tratadas utilizando o programa Gwyddion 2.54. Múltiplas áreas de cada amostra foram examinadas com o propósito de verificar a média de tamanho, rugosidade média de bactérias tratadas e não tratadas, utilizando o programa Gwyddion 2.54. Para a análise estatística dos resultados obtidos foi utilizado o programa GraphPad Prism 7.01., para obter a média de tamanho e rugosidade média de membrana das cepas foi aplicado o “teste t”. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os ensaios foram realizados pelo Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – BIOTEC da Universidade Federal do Delta do Parnaíba – Piauí – Brasil.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Galactomanana e derivados oxidados

4.1.1 *Rendimento do isolamento da galactomanana da Cassia fistula*

O rendimento da extração da galactomanana da *Cassia fistula* foi calculado considerando a massa inicial das sementes secas e a massa de galactomanana obtida após o processo de extração. O valor médio de 4 extrações foi de 26,5%±0,6. No presente estudo, a presença de galactomanana, 26,5%, foi relatada como superior à concentração de polissacarídeos encontrada por Jamir *et al.*, (2019), 24% para *Delonix elata* e Lavudi; Kottapalli; Goycoolea (2018) 21% para *Dichrostachys cinerea*. O processo de extração utilizado para as sementes de GCF pode ser considerado como eficiente. O percentual encontrado foi semelhante ao da maioria das sementes da família Caesalpiniaceae, tais como: as espécies de *Cassia grandis*; *Mimosa* sp.; *Crotalaria juncea*; *Prosopis juliflora* entre outras que produzem em termos de galactomanana, solúvel à temperatura ambiente, entre 25 a 30% (Buckeridge *et al.*, 1995).

4.1.2 *Determinação do grau de oxidação das amostras dos derivados oxidados*

Após a oxidação com periodato a solução final foi dialisada e liofilizada e o grau de oxidação real foi determinado pelo método da titulação de cloridrato de hidroxilamina para confirmar e quantificar o teor de aldeído. A Figura 9 mostra a evolução do pH das soluções tituladas. É possível observar que a curva para a amostra que contém GCF não apresenta um padrão de titulação, ou seja, não é observado ponto de equivalência, ocorre apenas um aumento do pH mediante a adição de hidróxido de sódio. Diferentemente, as outras curvas apresentam ponto de equivalência. À medida que o grau de oxidação aumenta ocorre um aumento do consumo de hidróxido de sódio durante a titulação, confirmando assim que ocorreu uma maior liberação de ácido clorídrico durante a reação entre o cloridrato de hidroxilamina e o polissacarídeo oxidado (Figura 10).

Figura 9 - Curvas de Titulação com NaOH, para GCF; CF10; CF20; CF50 e CF80 dissolvidos em cloridrato de hidroxilamina.

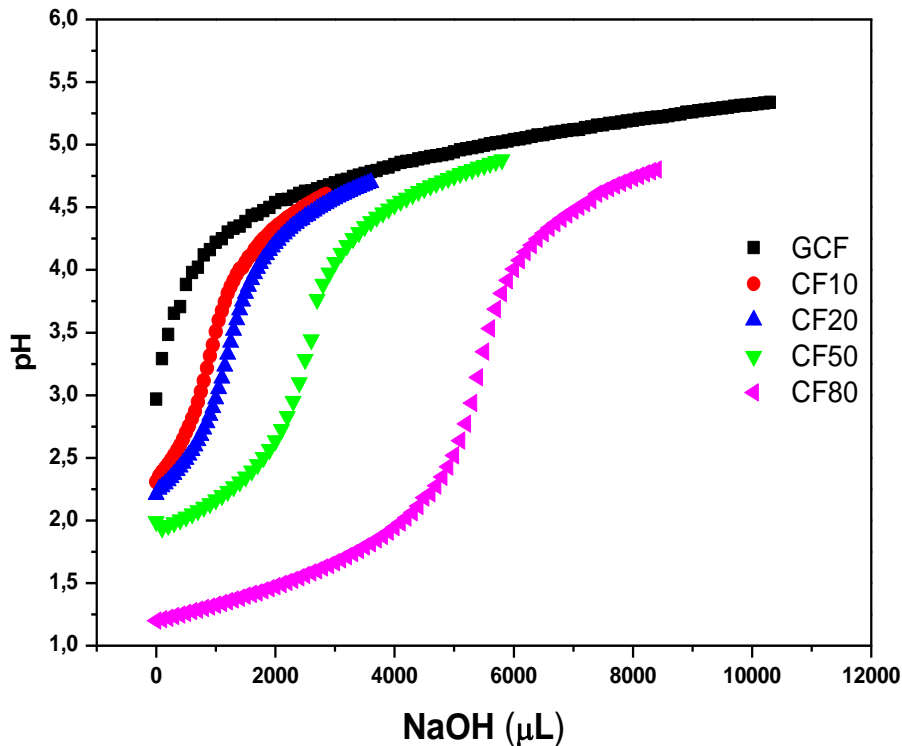
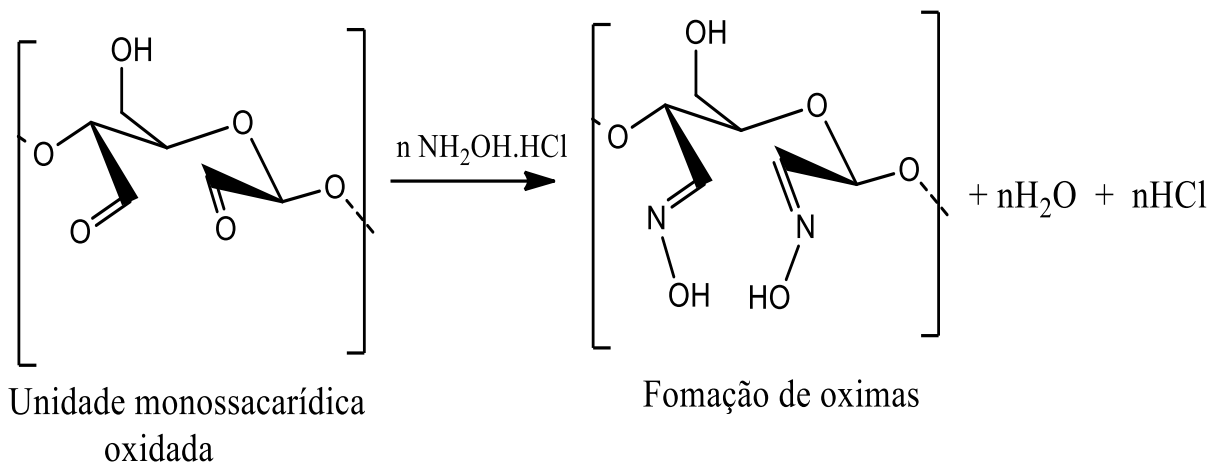


Figura 10 – Reação de formação de oximas e liberação de ácido clorídrico



Fonte: elaborada pela autora

Pode-se observar que, à medida que o grau de oxidação teórico aumenta, ocorre uma maior divergência em relação ao grau de oxidação real (Tabela 2). Isso pode ser explicado pela formação de hemiacetais, o que diminui a quantidade de aglomerados de aldeídos disponíveis. Outro fator importante é que com o aumento do

grau de oxidação, maior será a rigidez da cadeia e menor será a sua solubilidade, o que também diminui a quantidade de grupos aldeídos disponíveis para reação com a hidroxilamina, diminuindo assim o grau de oxidação real (Yu, Danmi *et al.*, 2007).

Como o aumento do grau de oxidação há um aumento dos grupos carbonilas que interagem com os grupos hidroxila formando hemiacetais, diminui a solubilidade em meio aquoso, a baixa solubilidade interfere no rendimento em massa da reação de oxidação, pois é realizada uma filtração antes da liofilização da solução oxidada.

Tabela 2 - Reação de oxidação com NaIO_4

Amostra	Grau de oxidação teórico (%)	Grau de oxidação experimental (%)	Rendimento da oxidação m_f/m_i (%)
GCF	0	0	0
CF10	10	9,0 ± 0,3	90,0 ± 3,0
CF20	20	18,0 ± 0,9	84,0 ± 7,8
CF50	50	41,0 ± 0,6	82,0 ± 5,0
CF80	80	72,0 ± 0,4	75,0 ± 3,4

m_i = massa inicial, antes da reação de oxidação

m_f =massa final, obtida após a reação de oxidação

Fonte: Dados da pesquisa

4.1.3 Estimativa da distribuição da massa molar por GPC

De acordo com a Tabela 3, a massa molar de pico (Mpk) diminui com o aumento do grau de oxidação, o que pode ser justificado devido à abertura da estrutura do anel de piranose, ocorrendo assim a degradação do polissacarídeo durante a reação de oxidação. Resultados semelhantes foram observados para derivados oxidados da goma do cajueiro e alginato de sódio (Gomez; Rinaudo; Villar, 2007; Resmi *et al.*, 2020). Também é observada uma diminuição na massa molar da ordem de 10^2 da GCF para os graus de oxidação 10; 20; 50 e 80% (Tabela 3).

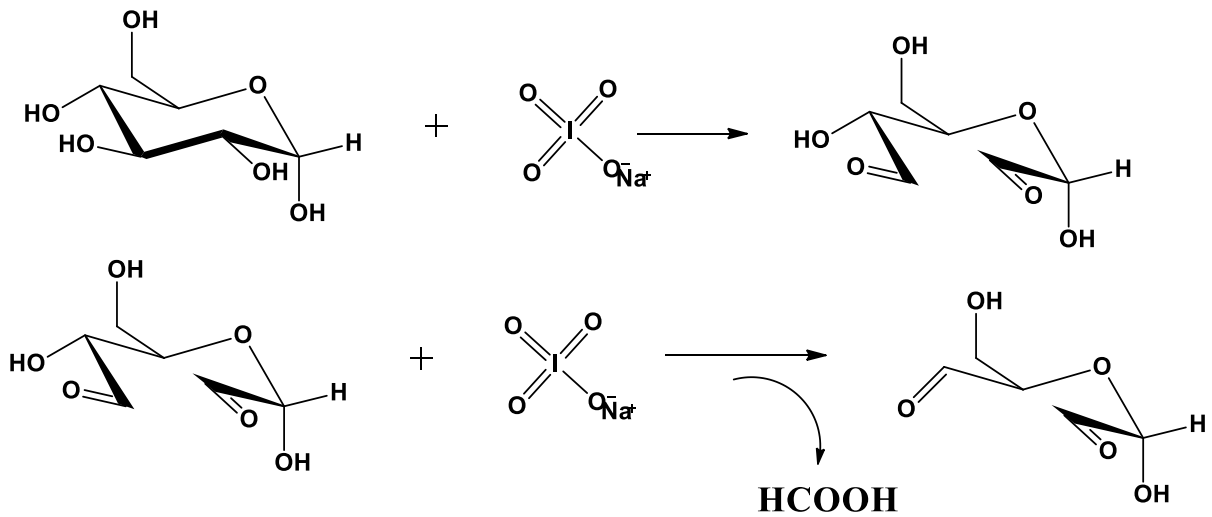
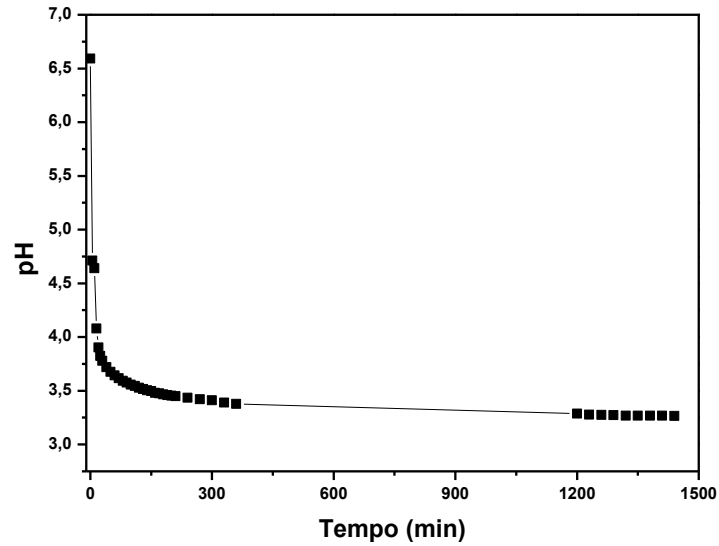
Tabela 3 - Distribuição da massa molar da GCF e derivados oxidados.

Amostra	Mw (g mol⁻¹)	Mp (g mol⁻¹)
GCF	2,34 x 10 ⁵	1,84 x 10 ⁶
CF10	2,18 x 10 ⁴	5,20 x 10 ⁴
CF20	1,57 x 10 ⁴	4,80 x 10 ⁴
CF50	6,80 x 10 ³	1,64 x 10 ⁴
CF80	2,80 x 10 ³	1,29 x 10 ³

Fonte: Dados da pesquisa

Esta alta redução da massa molar indica uma possível hidrólise devido à formação de ácido fórmico durante a reação. A unidade de galactose apresenta três grupos de hidroxila vicinais, estas estão passíveis a dupla oxidação. A dupla oxidação em uma unidade glicosídica favorece a liberação do carbono C3 como ácido fórmico. Isso é confirmado pela diminuição do pH da reação durante a reação de oxidação (Figura 11). Através do gráfico foi possível observar ainda a estabilização do pH após o período de 5 horas. Resultados semelhantes foram relatados por Maia *et al.*, (2005), que, além da variação do pH, também utilizou a RMN de ¹H para monitorar a liberação de ácido fórmico.

Figura 11 - Variação do pH (liberação de ácido fórmico) em relação ao tempo da reação de oxidação da GCF com periodato (a). Reação de oxidação com liberação de ácido fórmico (b)

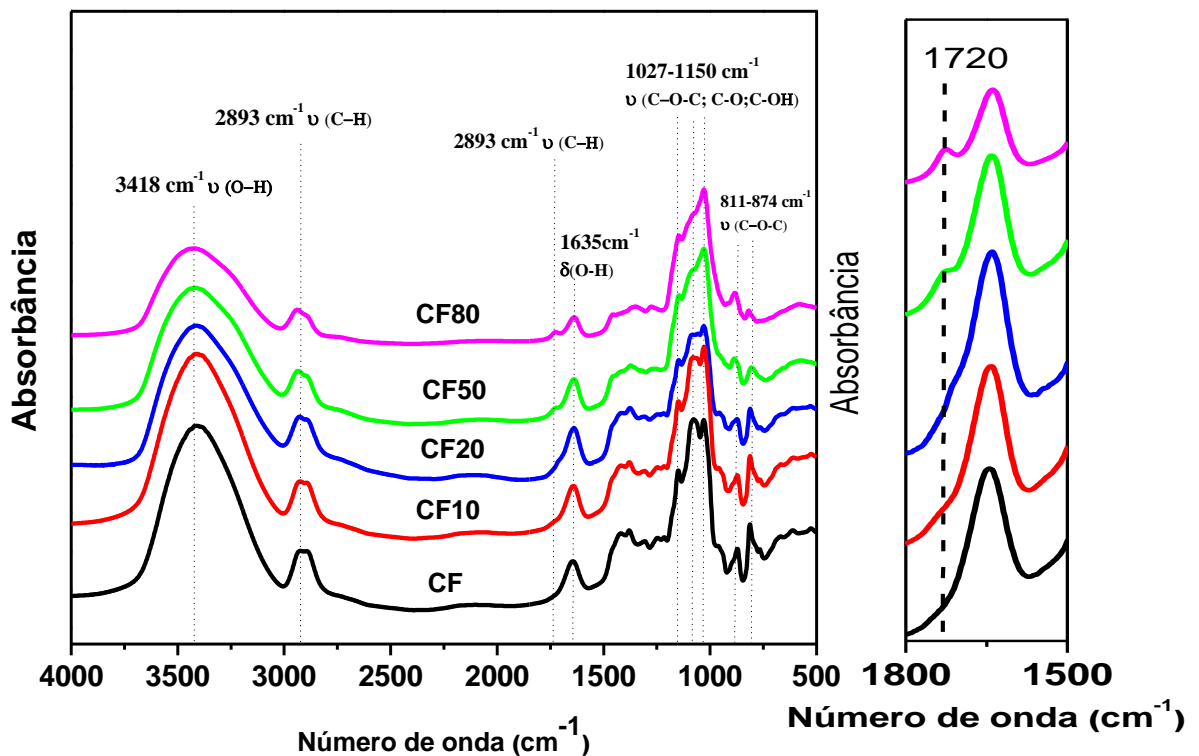


Fonte: Baseado em Keshk *et al.*, 2017

4.1.4 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho

A Figura 12 mostra os espectros de infravermelho da galactomanana isolada da *Cassia fistula* (GCF) e de seus derivados oxidados.

Figura 12 - Espectro na região do infravermelho para GCF e derivados oxidados (GCF, CF10, CF20, CF50 e CF80) e a expansão ao lado mostrando a região de grupo carbonil.



Fonte: Dados da pesquisa

O espectro mostra uma banda larga em 3418 cm⁻¹, que está associada ao estiramento O-H de hidroxilas ligadas a anéis de piranose e água adsorvida, vibrações simétricas e assimétricas de C-H em 2893 e 2924 cm⁻¹, respectivamente. O espectro mostrou bandas do grupo C-O (1150 cm⁻¹), C-O-C (1027 cm⁻¹) e C-OH (1074 cm⁻¹), indicando anéis de piranose. As bandas em 874 e 811 cm⁻¹ referem-se à deformação anomérica de β-D-manopiranosídica e α-D-galactopiranosídica, respectivamente, o

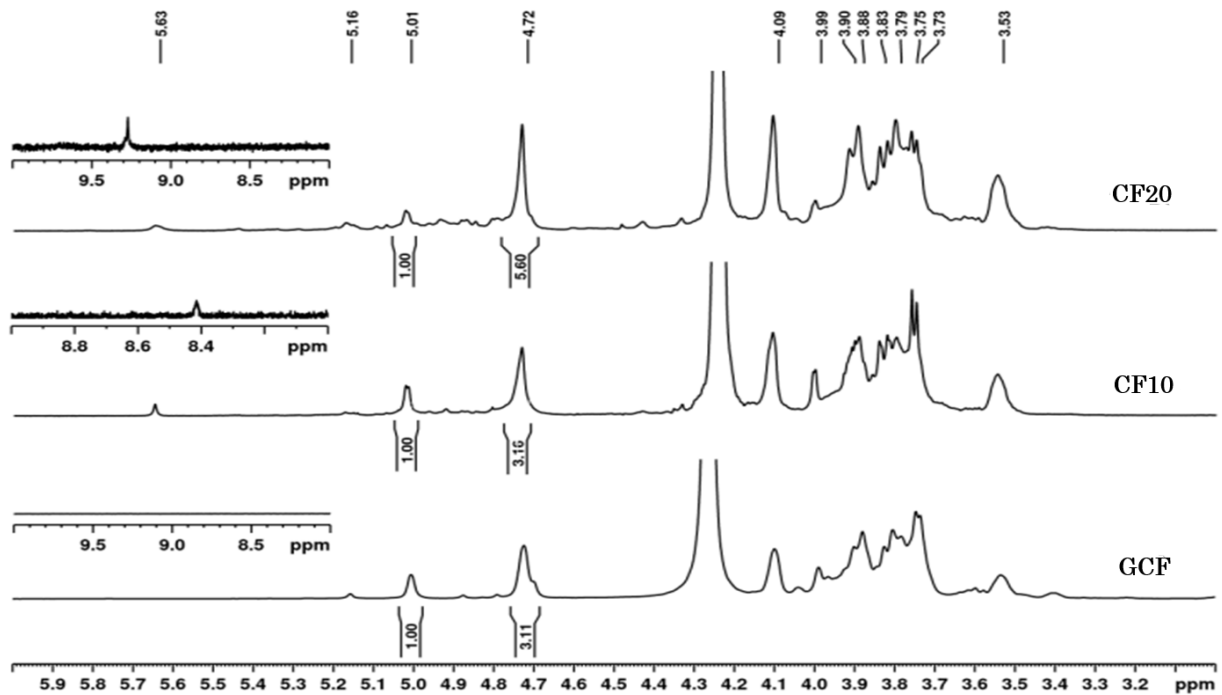
que indica a estrutura de uma galactomanana (Figueiró *et al.*, 2004; Lavudi; Kottapalli; Goycoolea, 2018; Li *et al.*, 2018; Rodriguez-Canto *et al.*, 2019).

As principais bandas referentes a galactomanana estão presentes em todos os derivados oxidados. No entanto, é difícil ver qualquer sinal referente aos grupos aldeído na amostra CF10. Nos espectros do CF20; CF50 e CF80, um pequeno ombro aparece na região aproximada de 1720 cm^{-1} . Este sinal refere-se ao estiramento do grupo carbonil (C=O) correspondente ao grupo aldeído. Isso confirma a oxidação das amostras. A baixa intensidade do sinal em 1720 cm^{-1} pode ser atribuída à formação de hemiacetais ou hidratos intramoleculares e intermoleculares o que tornam os grupos aldeído de difícil visualização no infravermelho (Sakakibara *et al.*, 2016; Siller *et al.*, 2015). Além do pequeno sinal em 1720 cm^{-1} outro indicativo da reação de oxidação é a diminuição da intensidade da banda em 1074 cm^{-1} referente ao estiramento C-OH, sugerindo que a reação modificou esta ligação (Zhang, Liru *et al.*, 2019).

4.1.5 Análise de Ressonância Magnética Nuclear

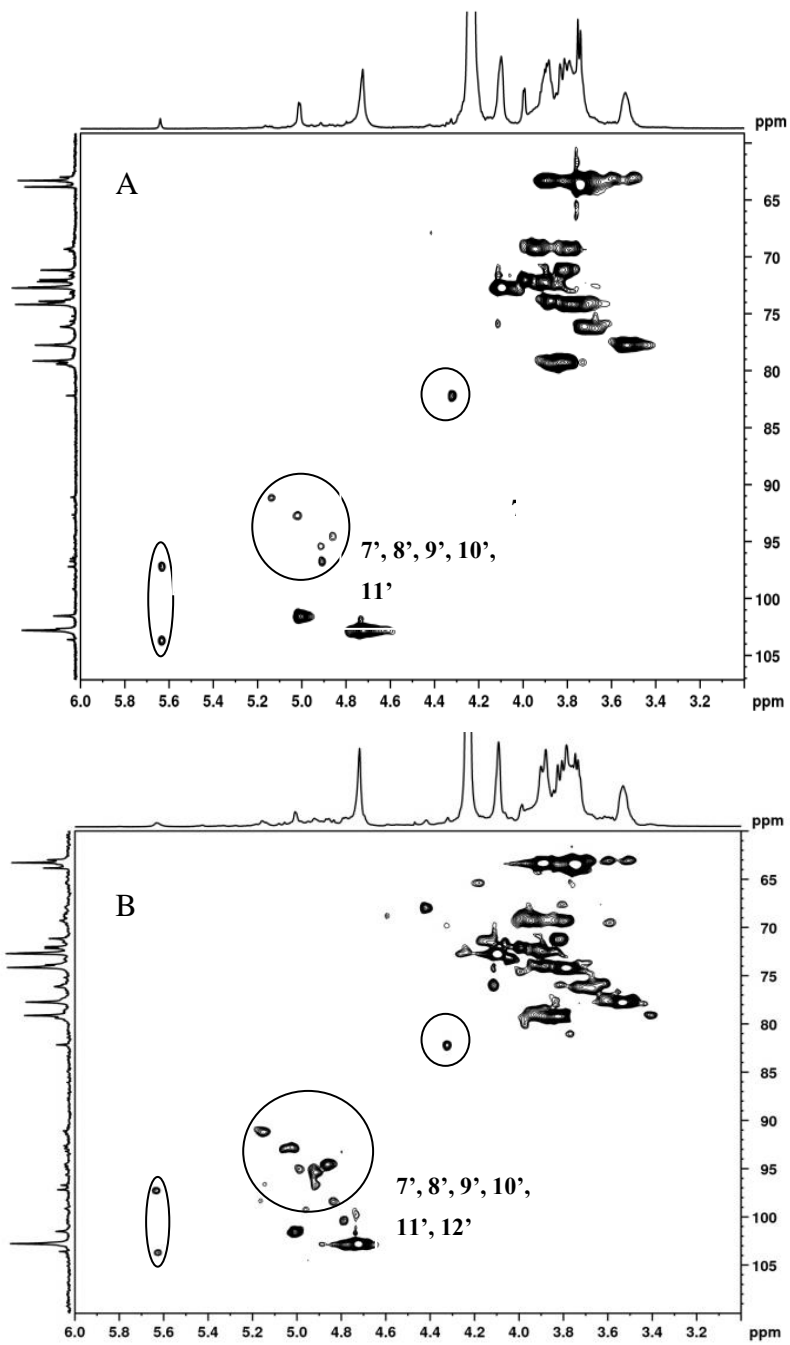
Os espectros de ^1H RMN (Figura 13) das amostras oxidadas mostram o aparecimento de novos sinais na região anomérica. A razão Man/Gal determinada aumenta de 3,11 ppm da amostra original de GCF para 3,16 ppm e 5,6 ppm nas amostras oxidadas 10% e 20%, respectivamente. Esse aumento indica que a oxidação ocorre preferencialmente nas unidades de galactose, que estão nas cadeias laterais (Gomez; Rinaudo; Villar, 2007). Um novo pico de baixa intensidade pode ser observado em 9,35 ppm (CF20) e 8,6 ppm (CF10), indicando a presença de grupamento livre de aldeído (-CHO). No entanto, a baixa intensidade apresentada é devida à formação de grupos hemiacetais ou aldeído hidratado (Maia *et al.*, 2005; Sakakibara *et al.*, 2016).

Figura 13 - Espectro de ^1H RMN da GCF e seus derivados oxidados CF10 e CF20



Fonte: Dados da pesquisa

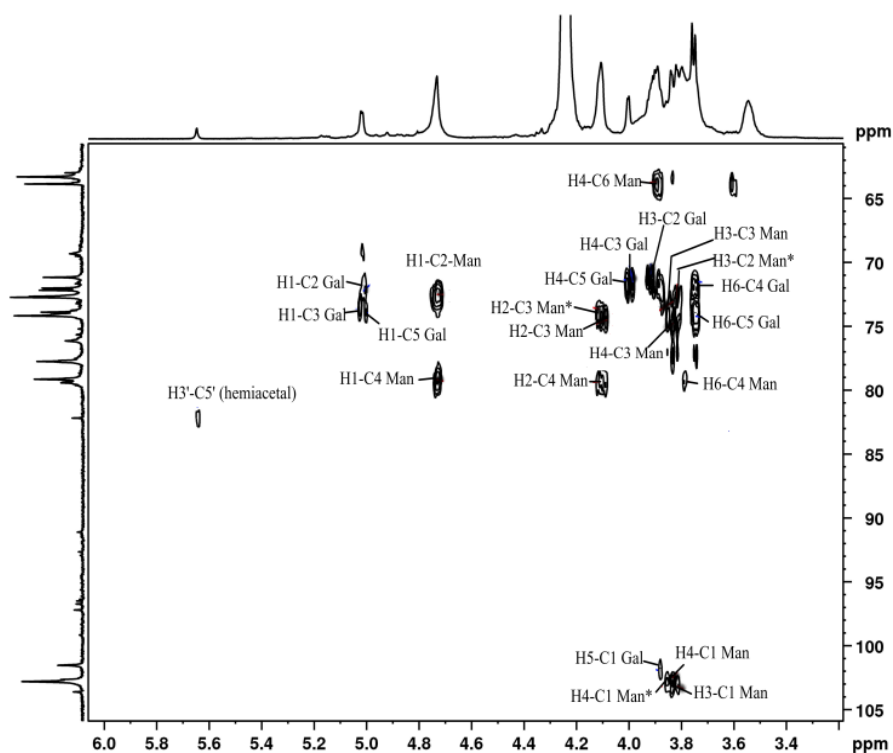
Os espectros ^1H - ^{13}C HSQC CF10 e CF20 (Figura 14) mostram uma mudança progressiva com o aumento do grau de oxidação. O aparecimento de novos picos na região anomérica 4,8-5,2 ppm indicados pelos números 5'; 7'; 8'; 9'; 10'; 11'; e 12', (estes sinais estão representados nas estruturas da Figura 16) também sugerem a formação de estruturas hemiacetálicas e hemialdais (Maciel *et al.*, 2019; Sirviö *et al.*, 2014). O espectro também mostra o surgimento de novos picos a 5,6 ppm que se correlacionam com carbonos a 97 e 105 ppm, o que seria bastante consistente com a estrutura hemiacetálica intramolecular (Figura 16D).

Figura 14 - Espectro ^1H - ^{13}C HSQC CF10 (A) e CF20 (B)

Fonte: Dados da pesquisa

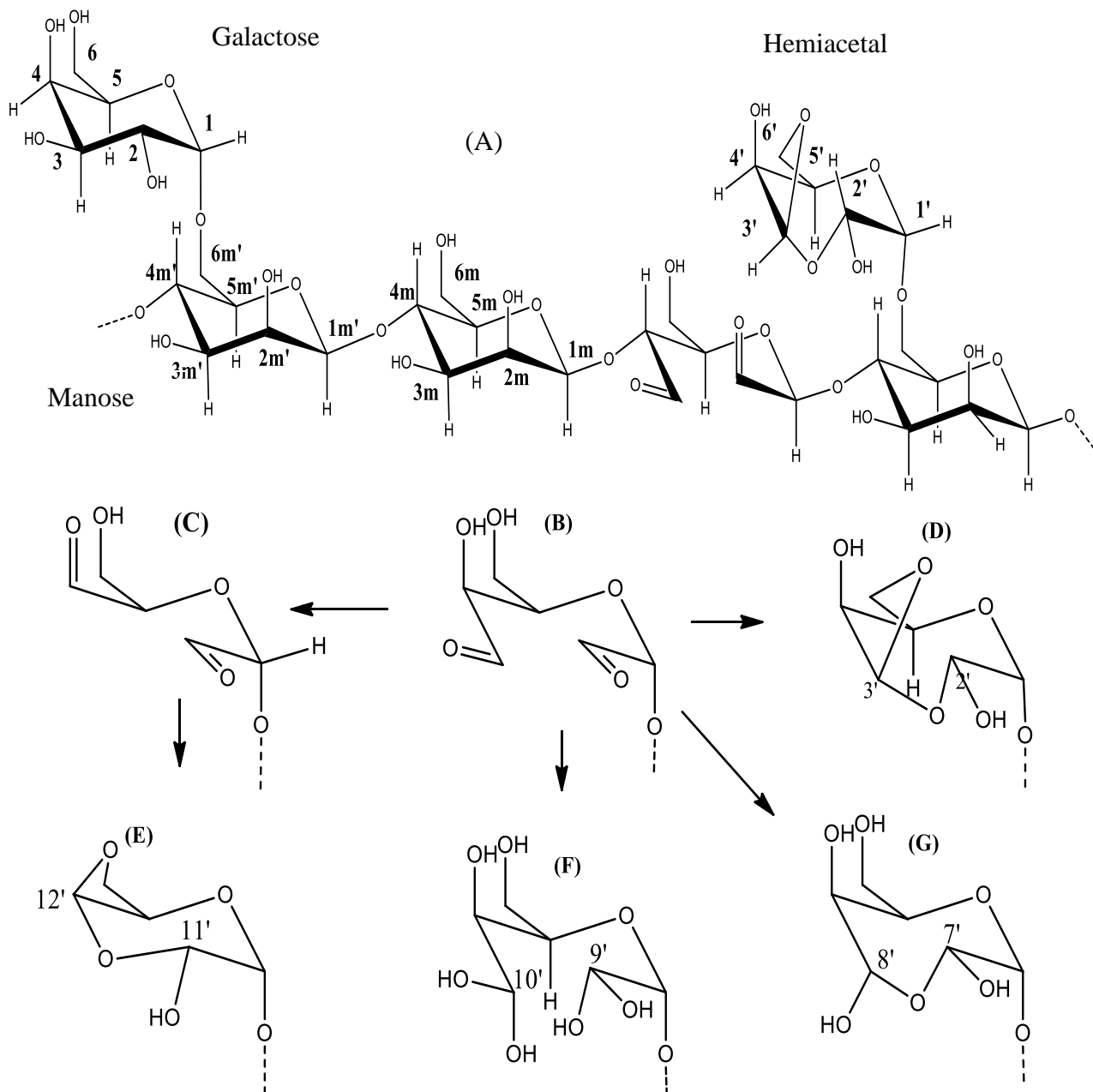
O espectro ^1H - ^{13}C HMBC CF10 (Figura 15) mostra sinais muito semelhantes à estrutura da galactomanana quimicamente não modificada, diferindo apenas alguns sinais, dentre eles um a 5,64/82,1 ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) consistente com a estrutura da Figura 16D. O espectro ^1H - ^{13}C HSQC (Figura 14A e 14B) confirma ainda a presença dessas estruturas hemiacetálicas com o aparecimento de sinais de ^{13}C na região de 90 a 105 ppm, característicos das estruturas cíclicas de carbono. Isso confirma a modificação química do material (Maia *et al.*, 2005).

Figura 15 - Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de CF10 a 70°C



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 16 - Possíveis estruturas da galactomanana após a oxidação (A); Galactose oxidada (B); Dupla oxidação da galactose (C); hemiacetal intra-residual (D) e (F); Aldeído hidratados (F) e hemialdal (G).



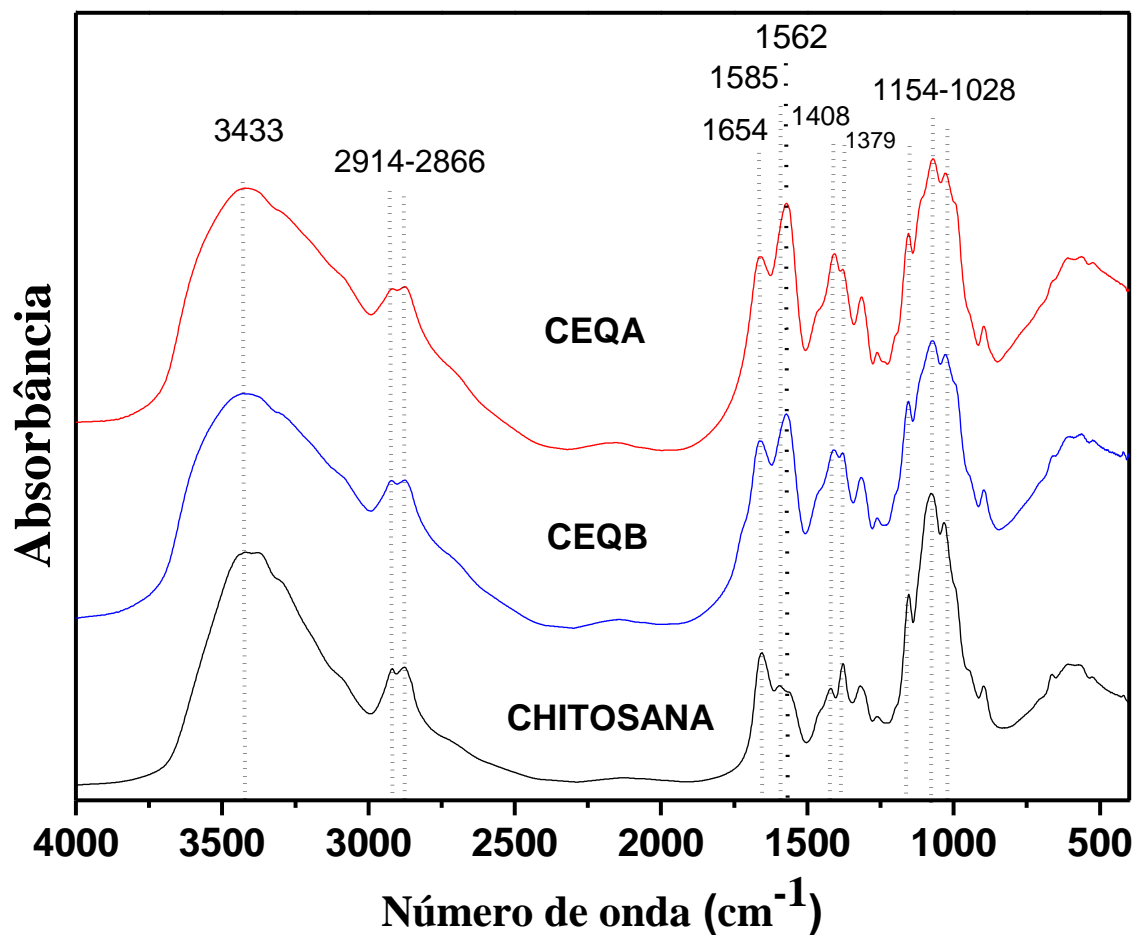
Fonte: Baseado em Maciel *et al.* (2019)

4.2 Quitosana e seus derivados carboxietilados

4.2.1 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho

A Figura 17 mostra os espectros de infravermelho para quitosana e seus derivados carboxietilados. O espectro para a quitosana apresentou bandas características. A faixa de 3307-3416 cm^{-1} foi atribuída às vibrações de estiramento de NH e OH, sobrepostas. A banda em 2866 e 2914 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento axial simétrico e assimétrico de C-H, respectivamente. A banda observada em 1654 cm^{-1} está relacionada à deformação simétrica do grupo amida I (C=O) e deformação angular de grupo amino (N-H), a banda em 1585 cm^{-1} se relaciona à deformação assimétrica da amida II (N-H). A banda em 1379 cm^{-1} é referente ao estiramento da ligação C-N. Já as bandas em 1028, 1076 e 1154 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações de estiramento de C-O-C, C-OH e C-O, respectivamente. Estes sinais confirmam a presença de anéis piranosídicos na estrutura. Comparando-se com a quitosana, novas bandas em 1562 e 1408 cm^{-1} podem ser observadas, após a carboxietilação, em CEQA e CEQB. Essas bandas são características de vibração de estiramento de grupos carboxílatos assimétricos e simétricos (-COO), respectivamente, além da diminuição da intensidade em 1654 cm^{-1} , referente ao grupamento amino (N-H), confirmando a reação de carboxietilação. Ao compararmos os espectros de CEQA e CEQB é possível observar que a banda em 1562 cm^{-1} em CEQA apresenta uma maior intensidade, relativa ao ácido acrílico foi incorporado em maior quantidade nesta amostra, (Huang *et al.*, 2016).

Figura 17 - Espectro na região do infravermelho da quitosana e derivados carboxietilados na forma de sal de sódio (Quitosana, CEQB e CEQA.)

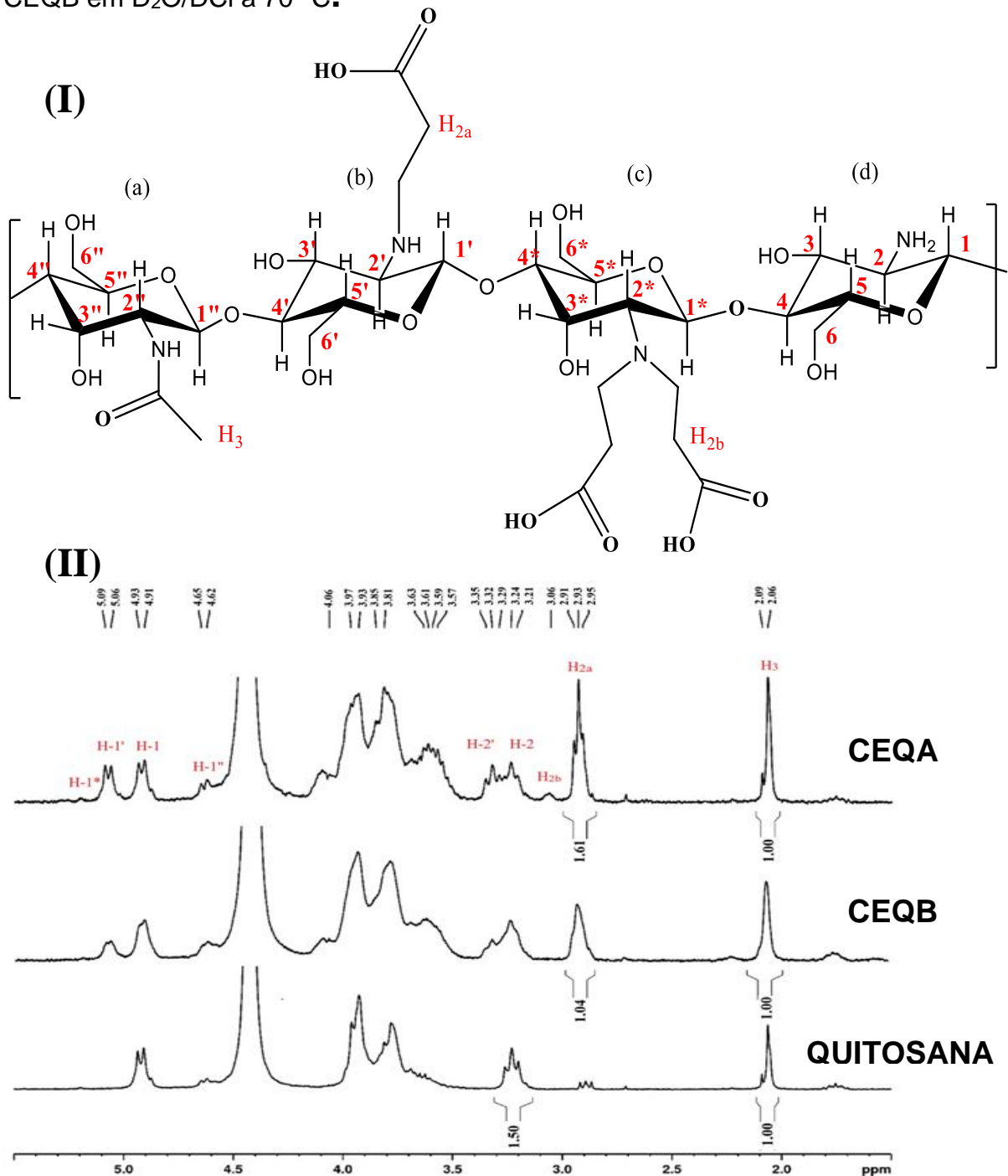


Fonte: Dados da pesquisa

4.2.2 Análise de Ressonância Magnética Nuclear

A Figura 18 mostra a estrutura da quitosana modificada e os espectros de ^1H RMN para quitosana e seus derivados carboxietilados CEQA e CEQB. A quitosana apresentou sinais característicos em 2,06 ppm, referentes a prótons de CH_3 do grupo acetil da unidade de N-acetil D-glucosamina (GlcNHCOCH_3), sinal em 3,24 ppm referente ao próton ligado ao carbono 2 da unidade de D-glucosamina (H-2, GlcNH_2), os sinais em 3,45 - 3,96 ppm se referem aos prótons ligados aos carbonos nas posições 3, 4, 5 e 6 das unidades de D-glucosamina acetilada e desacetilada. Na região de anomérico, observa-se a presença de sinais em 4,62 e 4,91 ppm referentes aos prótons H-1" e H-1 das unidades de D-glucosamina acetilada e desacetilada, respectivamente (Tang *et al.*, 2016). As amostras de CEQA e CEQB apresentaram os mesmos sinais presentes na quitosana, com acréscimos de alguns sinais tais como em 2,93 ppm referente ao próton de CH_2 da unidade de N-carboxietil D-glucosamina (H, CH_2COOH da GlcNHR), 3,32 ppm referente ao próton ligado ao carbono 2' da unidade de glucosamina carboxietilada (H-2, GlcNHR) e sinal em 5,06 ppm referente ao anomérico H-1' da N-carboxietil D-glucosamina. Para o espectro de CEQA é possível observar um pequeno sinal em 3,06 ppm (indicado por H_{2b} na Figura 18) e em 5,19 ppm (indicado por H-1* na Figura 19) que mostra a possibilidade de dupla enxertia de grupos carboxietil às unidades de D-glucosamina. Esses sinais seriam referentes ao próton de CH_2 da unidade dissubstituída de N-(2-carboxietil) D-glucosamina (H, CH_2COOH da GlcNHR_2) e ao próton anomérico dessa mesma unidade, respectivamente (Skorik *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2016). Com o aparecimento desses novos sinais se comprova a eficiência da enxertia de grupos carboxietil à cadeia da quitosana, comprovando assim a eficiência da reação.

Figura 18 - **(I)** Estrutura da carboxietil quitosana unidade acetilada (a), unidade monocarboxietilada (b), unidade com dupla enxertia (c), unidade D-glucosamina (d). **(II)** Espectro de ^1H RMN para quitosana purificada (QP) e derivados CEQA e CEQB em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ a 70°C .



Fonte: Dados da pesquisa

4.2.3 Determinação da viscosidade intrínseca, massa molar viscosimétrica média, grau de desacetilação da quitosana e grau de substituição dos derivados carboxetilados

As propriedades físicas e químicas da quitosana em solução são dependentes de: massa molar, grau de desacetilação, força iônica, pH e temperatura. Normalmente, com o aumento da temperatura, a viscosidade diminui (Sorlier; Viton, & Domard, 2002). A massa molar da quitosana pode ser determinada por cromatografia líquida de alta eficiência ou viscosimetria. Esta última é o método mais simples e rápido. A viscosidade intrínseca foi determinada pela equação de Huggins relacionando a viscosidade reduzida com a concentração. A constante de Huggins está relacionada com as interações entre polímero-polímero e polímeros-solventes. Experimentalmente bons solventes apresentam valores de K_H menores que 0,5. Os resultados experimentais indicam ainda que uma alta afinidade entre polímero e solvente, atribuindo boa solvatação, estaria relacionado a valores de K_H entre 0,25 a 0,50 (Costa *et al.*, 2015). Valores maiores que 1,0 podem ser atribuídos a associações intermoleculares. O valor da K_H encontrado para quitosana purificada foi de 0,44, o que indica que essa amostra de quitosana apresentou boa interação com o solvente utilizado. O valor da viscosidade intrínseca encontrado foi de $11,03 \text{ dL g}^{-1}$, a partir da viscosidade intrínseca utilizando a equação de Mark-Houwink-Sakurada foi possível calcular a massa molar viscosimétrica, o valor encontrado foi de $1,35 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$, esse valor está de acordo para massas molares de quitosana que variam entre 10^4 a 10^6 g.mol^{-1} (Kubota; Eguchi, 1997).

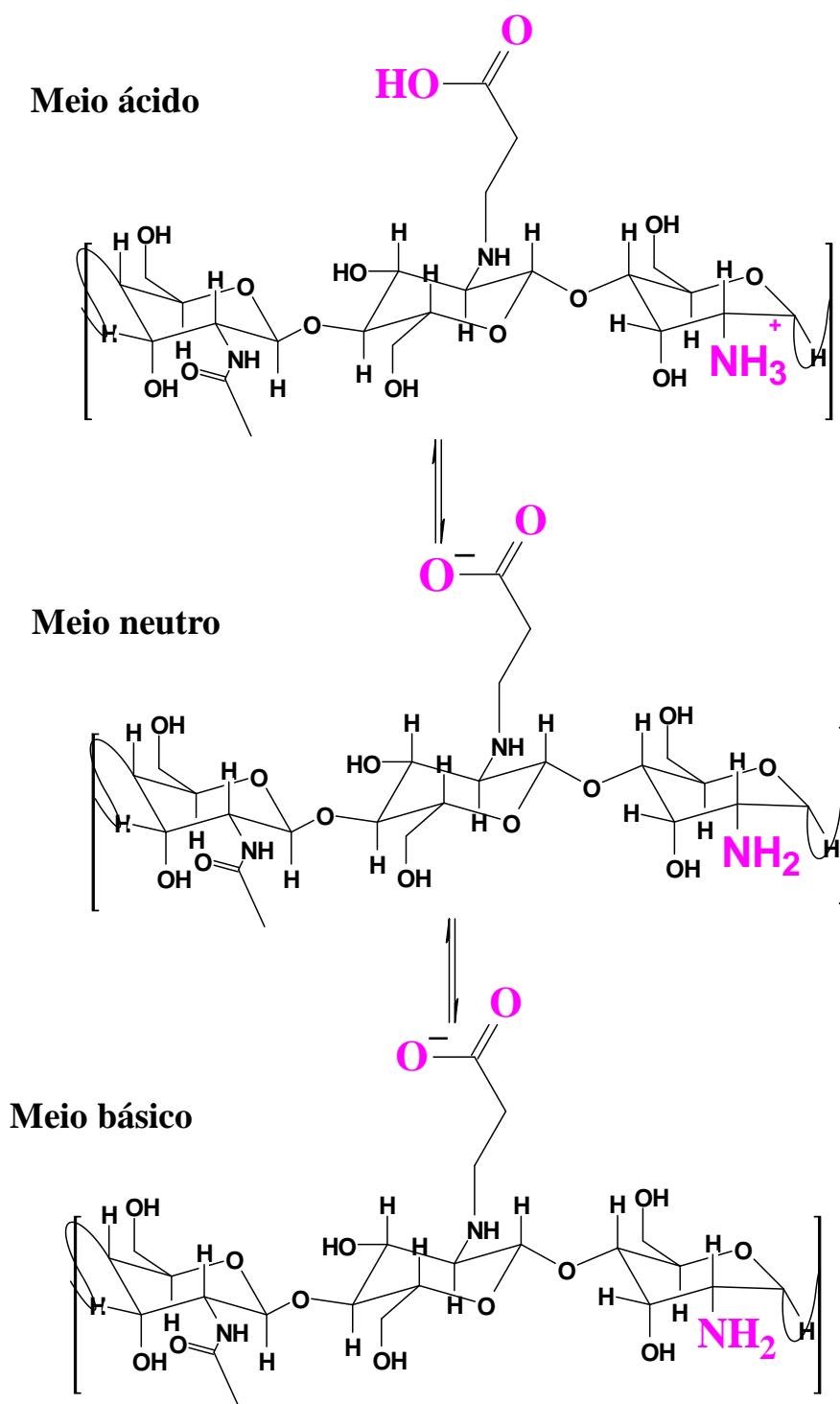
O grau de desacetilação encontrado pela análise elementar para a amostra de quitosana foi 77,5%, concordante com o valor encontrado pela análise de RMN (78%). Quitosana comercial apresenta valores médios do grau de desacetilação entre de 70 e 95% (Kubota; Eguchi, 1997). Os valores de grau de substituição (GS) das amostras carboxetiladas obtidas a partir das análises de RMN foram de 53% para CEQA, valor próximo ao encontrado por Qu *et al.* (2017) utilizando a mesma razão molar 4:1 (mol de ácido acrílico: mol de nitrogênio da quitosana), e 34% para amostra CEQB, valor muito próximo encontrado por Pestov *et al.* (2011), utilizando a mesma razão molar de 1:1 (mol de ácido acrílico: mol de nitrogênio da quitosana). Durante a reação pode ocorrer a possibilidade de dupla enxertia de grupamentos carboxetil em

substituição aos hidrogênios ligados ao nitrogênio da D-glucosamina, o que de fato ocorreu como foi observado no espectro de ^1H RMN.

4.2.4 Solubilidade da quitosana e seus derivados e reação de formação dos hidrogéis

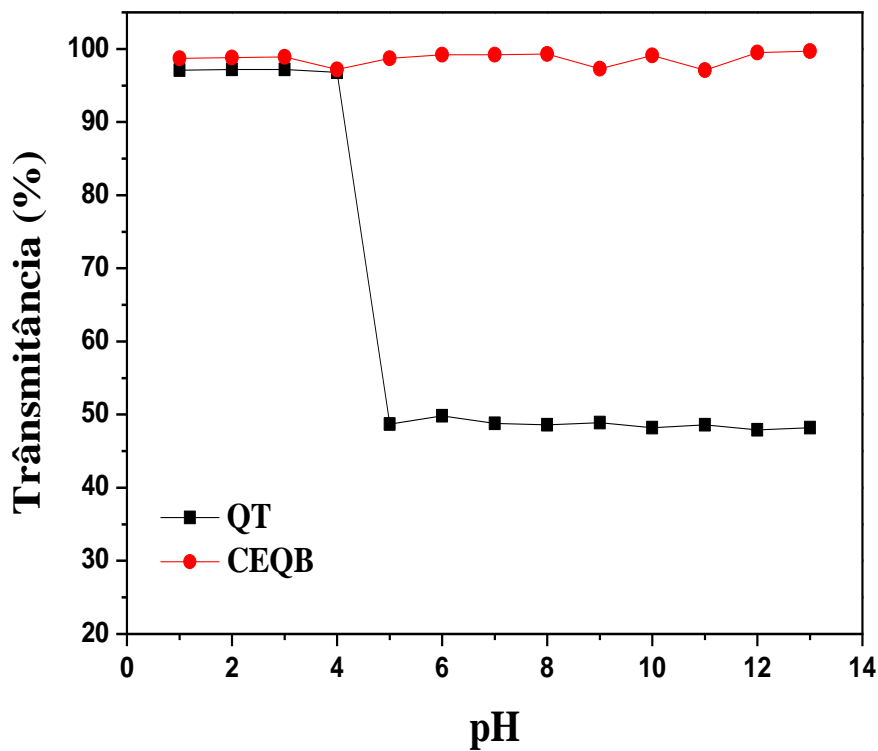
A quitosana foi modificada quimicamente com a introdução de grupos carboxietil, o que torna solúvel em meio aquoso. A reação de adição de Michael entre quitosana e ácido acrílico é regioseletiva para o grupo amino da quitosana, que é um nucleófilo mais forte que os grupos hidroxilas presentes na estrutura. A reação ocorre sem a necessidade de adição de ácidos ou bases, e não forma produtos secundários, além da água (Privar *et al.*, 2020). A introdução de grupamentos carboxietil torna a quitosana solúvel em soluções aquosas neutras ou em soluções básicas. Como é possível observar nas Figuras 20 e 21, os derivados obtidos neste estudo (CEQA e CEQB) apresentaram-se solúveis em diferentes pHs (1 – 14), já a quitosana foi solúvel apenas em pH abaixo de 5,5, como já era esperado. A solubilização da quitosana se deve à protonação dos grupamentos aminos primários ($-\text{NH}_2$). Quanto maior a quantidade destes grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e maior a solvatação em água. Já a carboxietilquitosana, que apresenta grupos NH_2 e $-\text{COOH}$, em valores baixos de pH ambos estão protonados, NH_3^+ e $-\text{COOH}$. Entre 5,5-6,5 a amina está protonada e o grupo carboxílico na forma de carboxilato o que resulta em um aumento da sua solubilidade. Acima de 6,5, ambos estão desprotonados, o efeito da maior solubilidade se deve ao grupo carboxilato (Figura 19). A presença desses íons em diferentes valores de pH torna o derivado solúvel em uma ampla faixa de pH (Ibrahim; Mostafa; Kandile, 2020; Sashiwa *et al.*, 2003a)

Figura 19 – Variação da carboxietilquitosana em diferentes valores de pH

Fonte: Baseado em Ibrahim *et al.* 2020

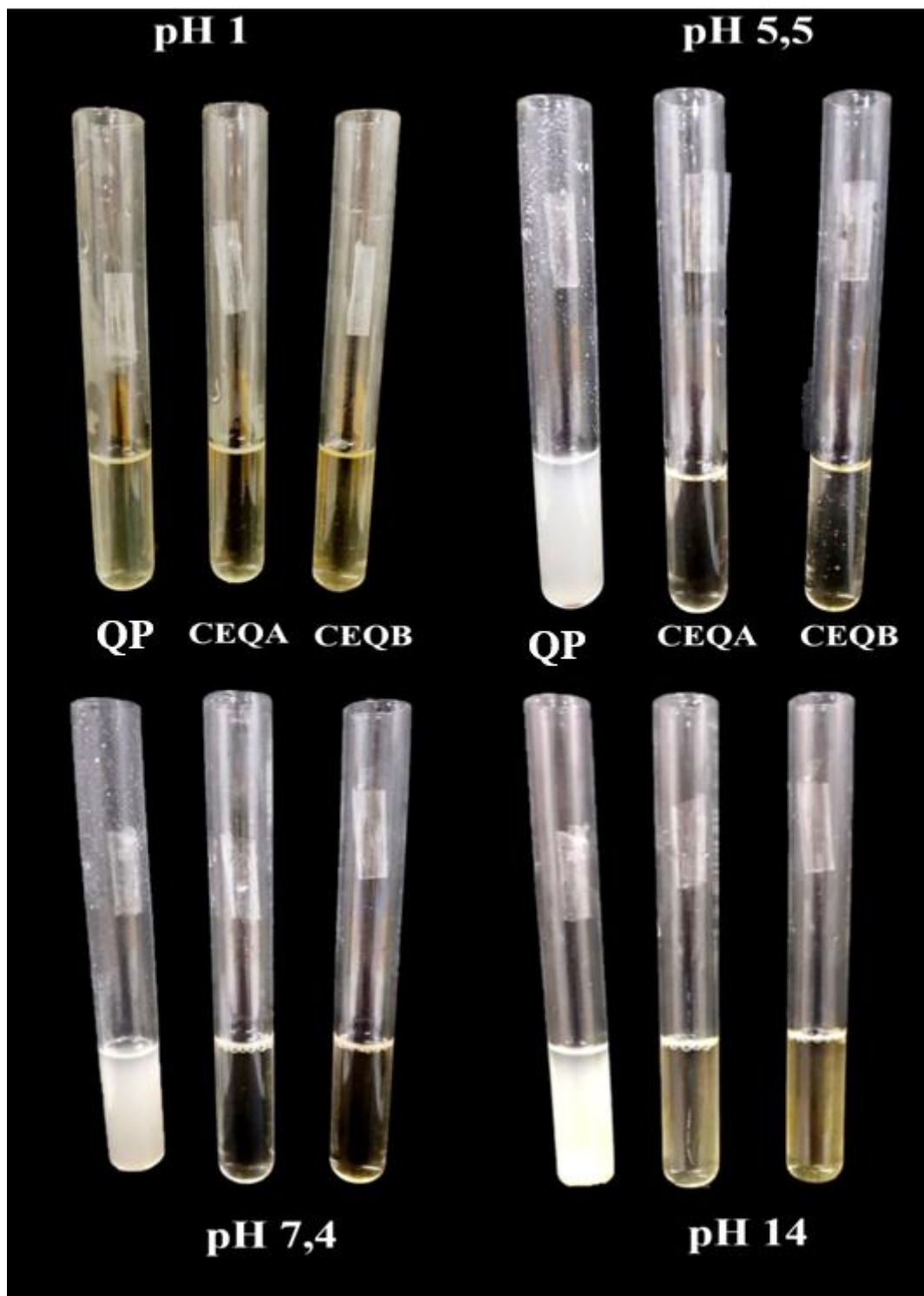
Com o aumento da solubilidade em ampla faixa de pH (1-14), além de sua biocompatibilidade, não toxicidade e atividade antibacteriana, a quitosana se torna uma excelente candidata na preparação de materiais para aplicações biomédica. Comparando com outros métodos existentes na literatura, a modificação com ácido acrílico é considerada menos danosa ao meio ambiente, pois dispensa a utilização de solventes orgânicos (Ibrahim; Mostafa; Kandile, 2020; Li, Yongsan *et al.*, 2017; Liu, Jia *et al.*, 2016)

Figura 20 – Solubilidade das amostras de CEQB e quitosana purificada em diferentes pH, a 25 °C e concentração de 2% m/v.



Fonte: Dados da pesquisa

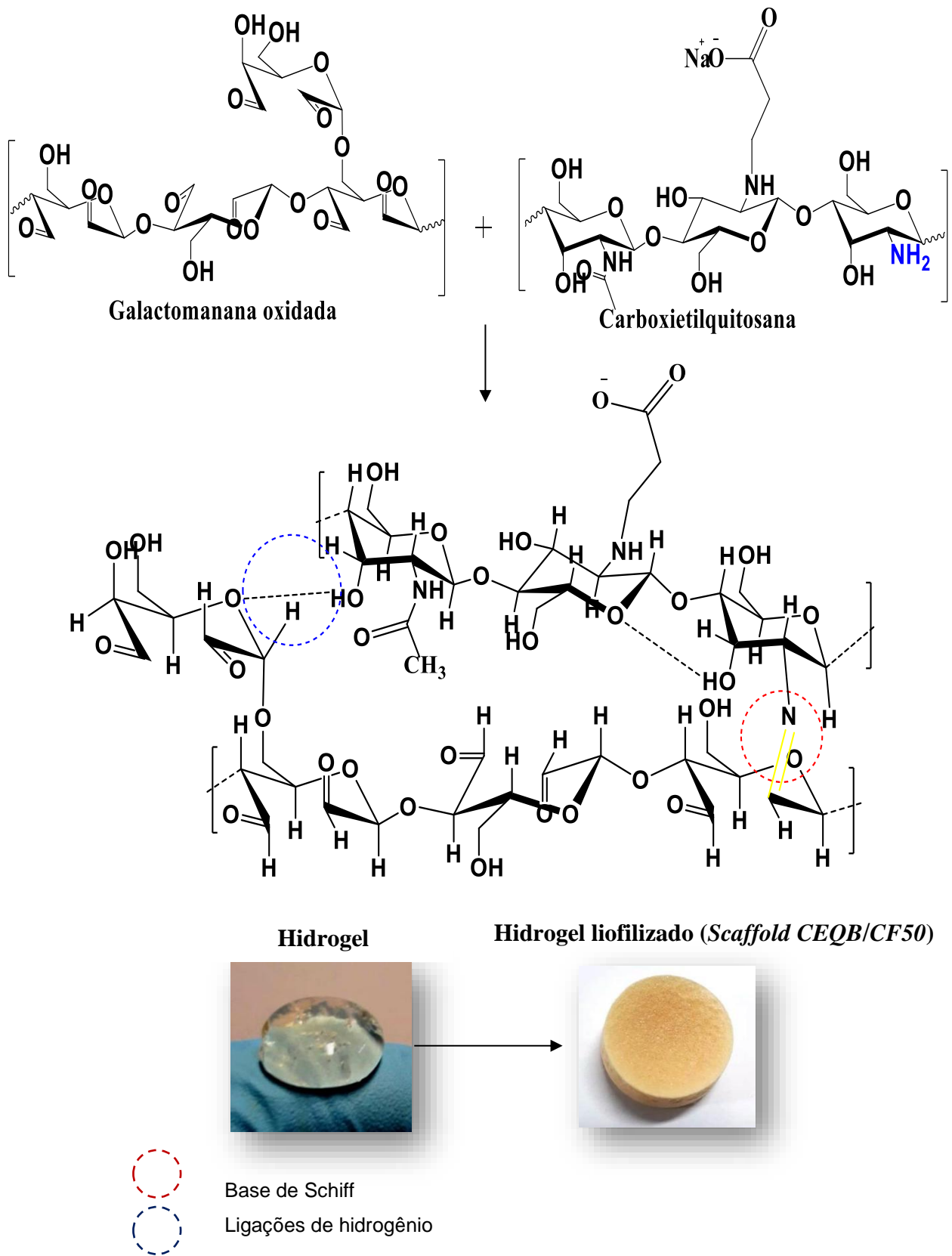
Figura 21 - Aparência macroscópica das soluções de CEQA e CEQB comparadas à da quitosana não modificada (todas na concentração de 2,0% m/v).



Fonte: elaborada pela autora

Os hidrogéis deste estudo foram preparados em meio aquoso de acordo com o esquema mostrado na Figura 22.

Figura 22 - Esquema ilustrando a formação do hidrogel de carboxietilquitosana e galactomanana oxidada.

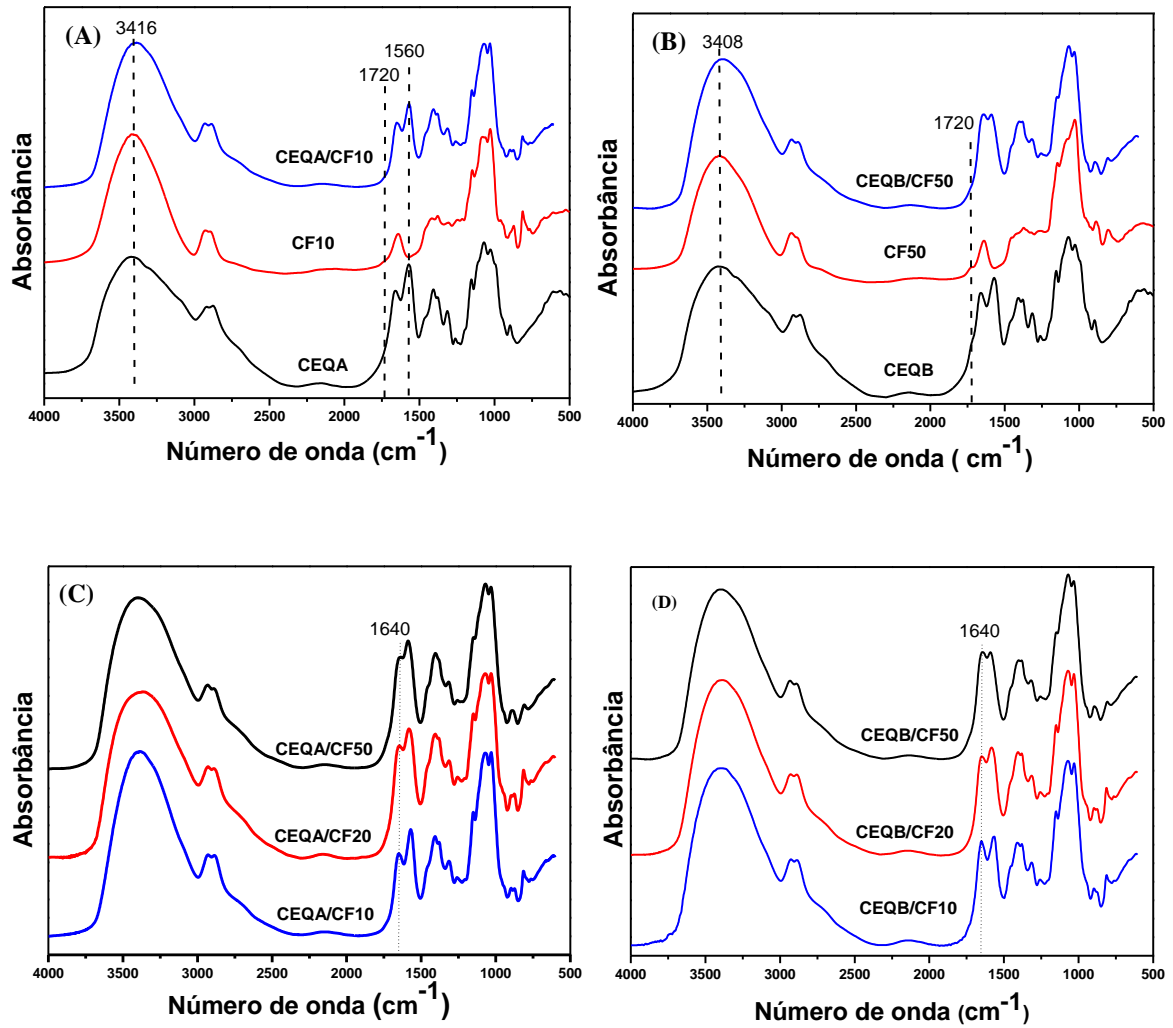


Fonte: elaborada pela autora

4.2.5 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho dos scaffolds

Os espectros da Figura 23A mostram o *scaffold* que apresenta a menor quantidade de pontos de reticulação e seus precursores (CEQA/CF10; CF10 e CEQA). Na Figura 23B são mostrados os espectros para o *scaffold* com mais pontos possíveis de reticulação e seus precursores (CEQB/CF50; CF50 e CEQB). É possível observar o desaparecimento da banda em 1720 cm^{-1} no espectro de CF10 e CF50, referente à vibração de estiramento do grupo carbonil (C=O). Comparando-se CEQA e CEQB com CEQA/CF10 e CEQB/CF50, observa-se um estreitamento da banda em 3416 cm^{-1} (Figura 23A) e em 3408 cm^{-1} (Figura 23B) referente ao alongamento das vibrações de N-H indicando a possibilidade de reação destes grupos para formação da base de Schiff. Os espectros dos géis formados com CEQA e CEQB, Figura 23C e 23D, mostram uma diminuição das bandas referentes aos grupos aminos (1640 cm^{-1}), com o aumento do grau de oxidação, o que sugere a formação da base de Schiff e que a reação é favorecida com o aumento do grau de oxidação da GCF.

Figura 23 - Espectro na região do infravermelho dos *scaffolds* e seus precursores (CEQA, CF10 e CEQA/CF10) -(A); (CEQB, CF50 e CEQB/CF50)-(B); (CEQA/CF10, CEQA/CF20, CEQA/CF50)-(C) e (CEQB/CF10, CEQB/CF20, CEQB/CF50)-(D).



Fonte: Dados da pesquisa

4.2.6 Tempo de Geleificação

O tempo de geleificação é um dos parâmetros importantes para a caracterização dos sistemas de hidrogel, tanto para correlacionar as modificações na estrutura com as propriedades quanto para direcionar as possíveis aplicações para esses materiais. Na Figura 24A é possível observar a formação do hidrogel durante o movimento da barra magnética, na Figura 24B observa-se a formação do hidrogel pela inversão de tubo. Os tempos de geleificação das amostras estão resumidos na Tabela 4.

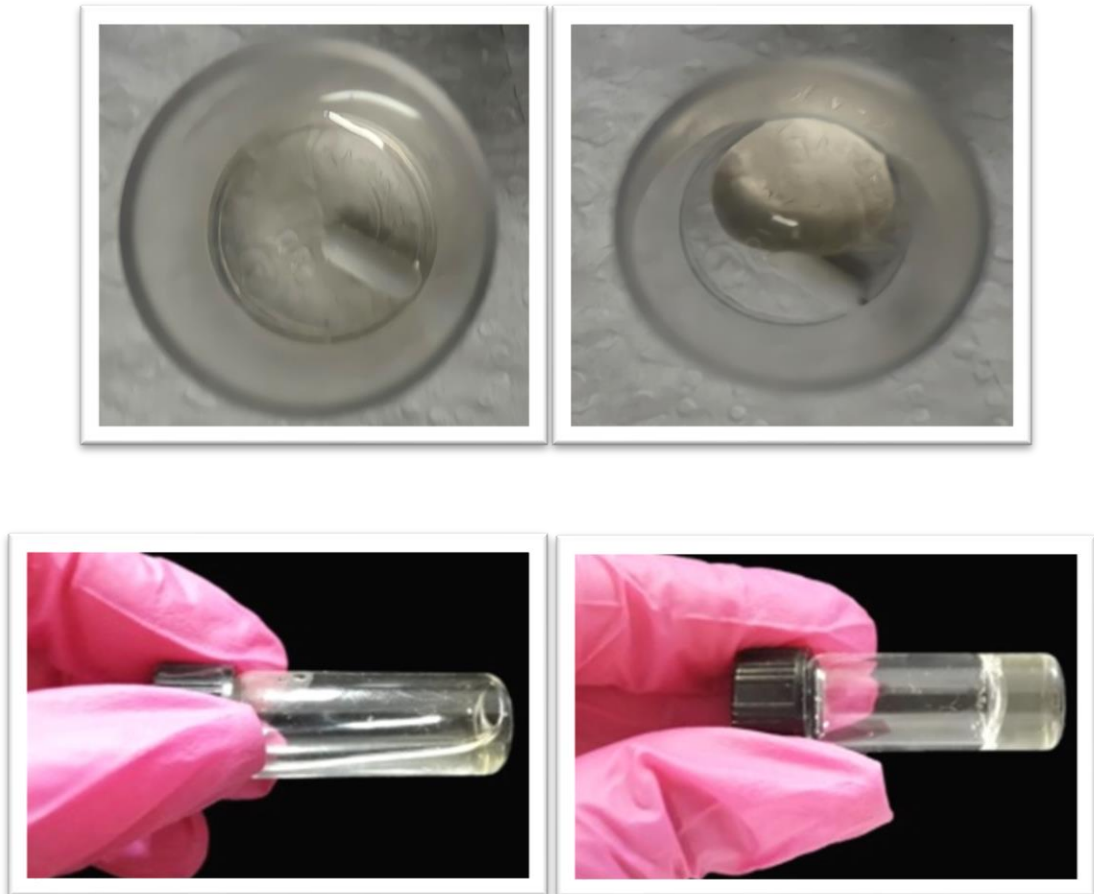
Tabela 4 - Tempo de geleificação dos hidrogéis, preparados com diferentes graus de oxidação e volumes iguais do derivado oxidado e de CEQ a 37 °C.

Amostra	CEQA/CF1 0	CEQA/CF2 0	CEQA/CF5 0	CEQB/CF1 0	CEQB/CF2 0	CEQB/CF5 0
Tempo (s) Inversão de tubo	188 ± 2,1	63,7 ± 2,5	48,7 ± 1,5	182 ± 1,7	59,5 ± 2,1	37,0 ± 0,7
Tempo (s) Barra Magnética	167 ± 0,1	65,4 ± 0,3	57,0 ± 0,4	110 ± 1,5	42,8 ± 0,5	29,0 ± 0,3
Tempo (s) Reômetro ^(a)	120 ± 1,5	61,2 ± 1,3	---	137 ± 2,3	---	---

a= O tempo de geleificação é considerado quando o valor $G'=G''$ no ensaio reológico.

--- = não foi possível visualizar o tempo de geleificação.

Figura 24 - Formação do hidrogel CEQB/CF50 pelo método da barra magnética (A) e pelo método da inversão de tubo (B) ambas a 37 °C.



Fonte: elaborada pelo autor

Observa-se que o tempo de geleificação é dependente da formulação de cada hidrogel. À medida que o grau de oxidação da GCF aumenta e o grau de substituição da quitosana (CEQ) diminui, os géis se formam em menor tempo, variando de 33 a 158s. Isso pode ser explicado pelo aumento de grupos aldeídos e de aminas livres, permitindo o aumento da reticulação através da formação da base de Schiff, reduzindo assim o tempo de formação do hidrogel. Resultado semelhante foi obtido para o hidrogel formado com alginato oxidado 45%/carboxietilquitosana que apresentou tempo de geleificação por reometria de 47s (CHEN *et al.*,2017), e para carboxietilquitosana (DS 35%)/dextrana oxidada (grau de oxidação de 47%) o valor encontrado por Cao, Bai, Wang, Ren, & Ma, (2021) para carboxietilquitosana na razão

de 1:1 com tempo de geleificação de 35 segundos medido pelo método da inversão de tubo.

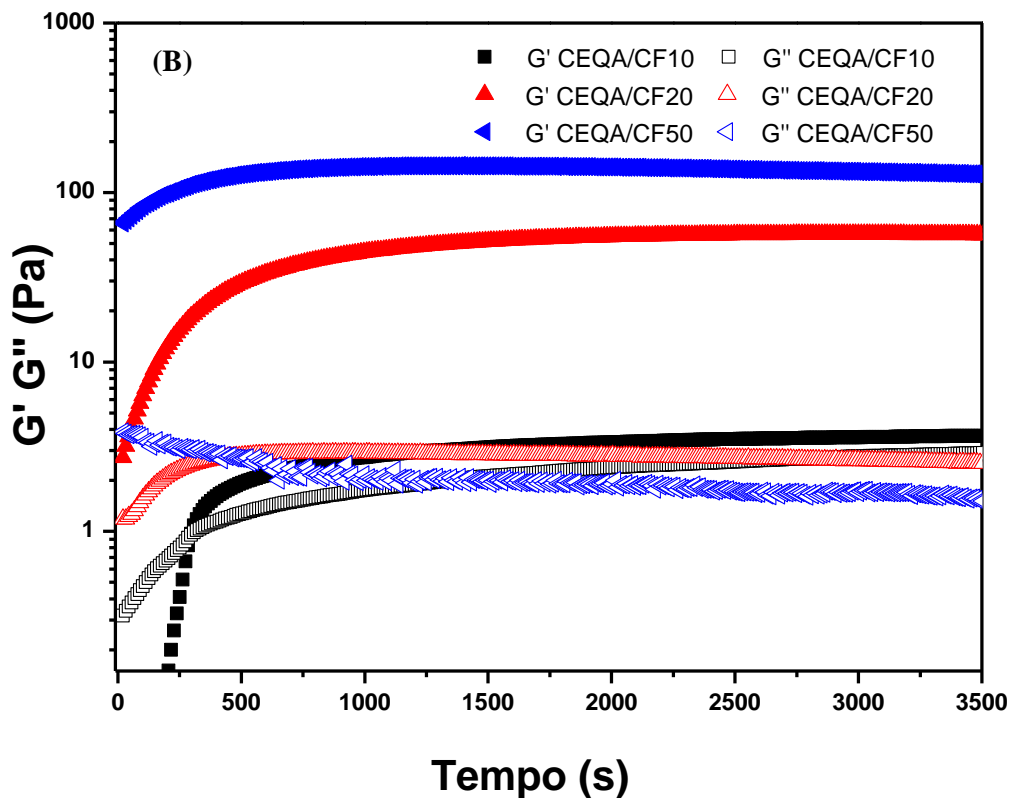
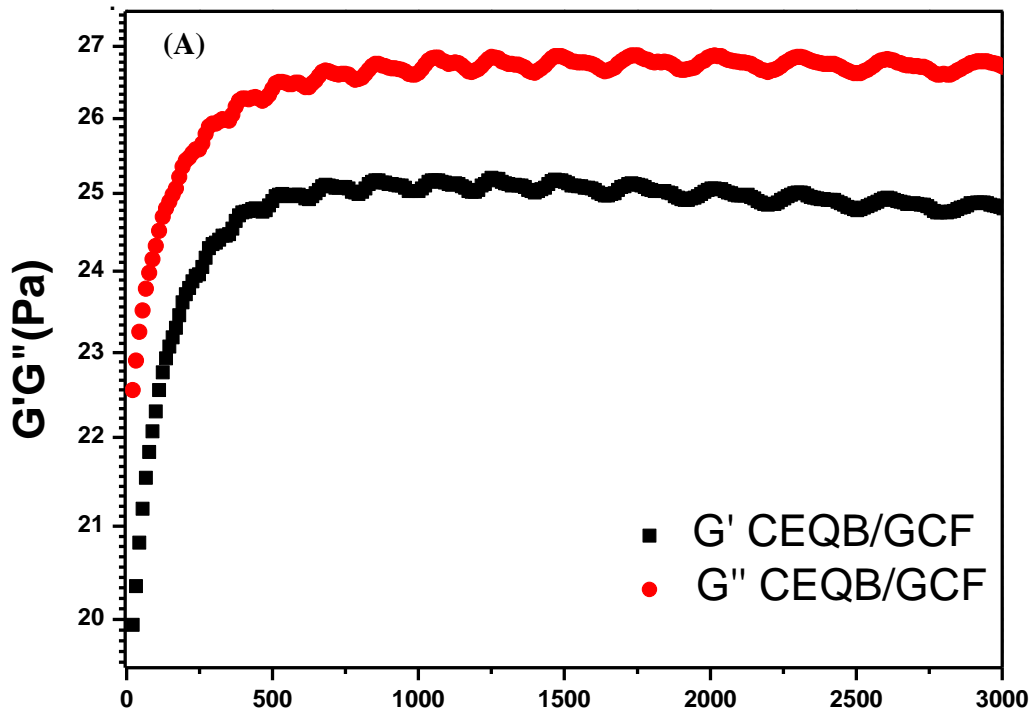
4.2.7 Análise Reológica

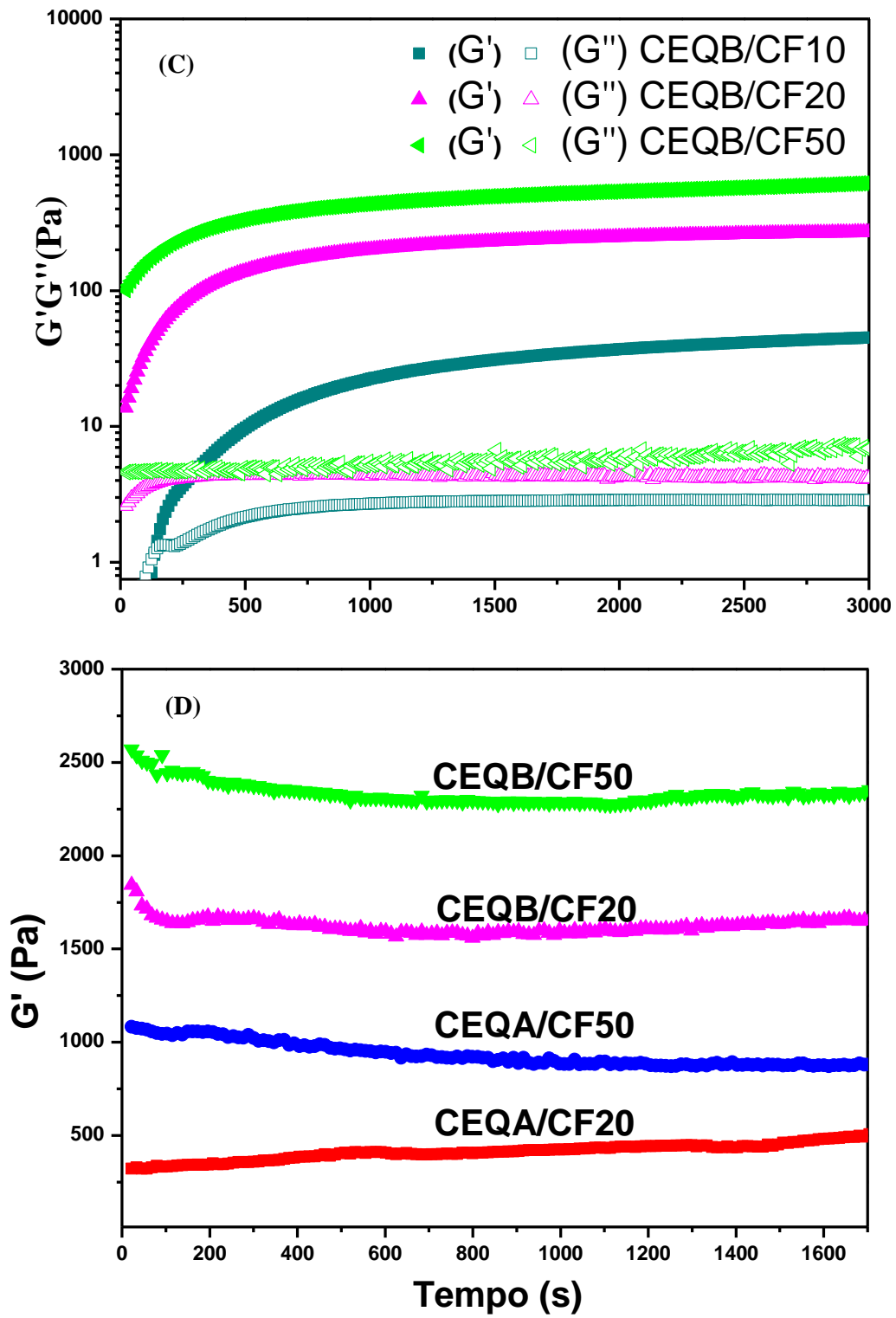
As propriedades viscoelástica dos hidrogéis, módulo de armazenamento (G') que representa a medida de resistência a deformação elástica e módulo de perda (G''), que é uma medida de resistência ao fluxo de líquido, foram plotadas em função do tempo a 37 °C (Figura 25).

Para a solução de CEQB/CF (Figura 25A), observa-se que G'' é maior ao longo de todo intervalo de tempo, ou seja, a amostra apresenta característica de um líquido viscoso. A GCF *in natura* não apresenta grupos aldeído para que ocorra a formação de ligações covalentes com a carboxietilquitosana, o que mostra que não há interações tão efetivas entre os polissacarídeos que possa ocorrer à formação do hidrogel. No entanto, quando se realiza a mesma medida com o polissacarídeo oxidado (Figura 25B e 25D), observa-se o crescimento dos valores dos módulos G' e G'' . O aumento dos valores de G' é proporcional ao grau de oxidação. Quanto maior o grau de oxidação maior o valor do módulo de armazenamento (G') e a transição sol-gel acontece em um tempo menor. As amostras CEQB/CF50 e CEQB/CF20 formam géis mais rígidos que os géis de CEQA/CF50 e CEQA/CF20. Esse comportamento pode ser explicado mais uma vez pelo aumento de pontos de reticulação ao longo das cadeias do hidrogel. O mesmo comportamento foi revelado nas Figura 25C, quando se comparam os diferentes CEQ. Quanto menos modificada a CEQ, mais grupos amino livres poderão interagir com o polissacarídeo oxidado de modo que os géis exibem módulo de armazenamento maior (G'), conseqüentemente géis mais rígidos.

A análise foi repetida 24 horas após o início da reticulação (Figura 25D), é possível observar o aumento nos valores de módulo elástico (G') que variaram entre 2,5 e 0,5 kPa para as amostras com maior e menor grau de oxidação, respectivamente. Isso demonstra que a reação continua ocorrendo neste período. Resultados semelhantes foram encontrados para hidrogéis formados por dextrana oxidada e quitina quartenizada (Xu; Zhang; Cai, 2019). Os valores de G' apresentados se assemelham aos valores relatados para tecidos moles que variam de 0,1 kPa a 1 MPa (Liu, Juan *et al.*, 2015).

Figura 25 - Variação do módulo de armazenamento (G') e do módulo de perda (G'') para CEQB/CF (A); para os hidrogéis CEQB/CF50; CEQA/CF50; CEQA/CF20; CEQB/CF20; CEQA/CF10 e CEQB/CF10 (B e C); Variação do módulo de armazenamento (G') para os hidrogéis CEQB/CF50; CEQA/CF50; CEQA/CF20 e CEQB/CF20 a 37 °C (D).





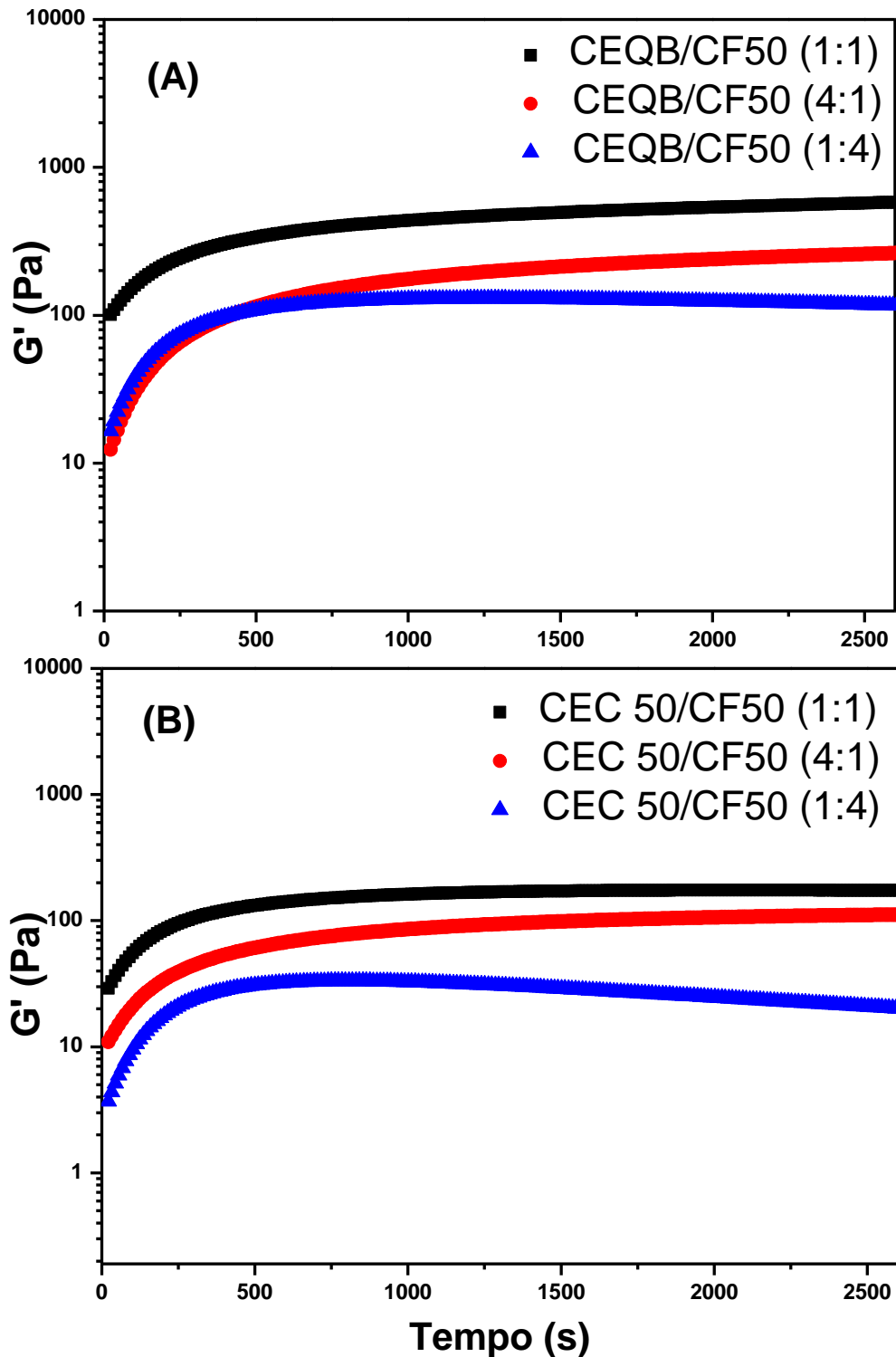
Fonte: Dados da pesquisa

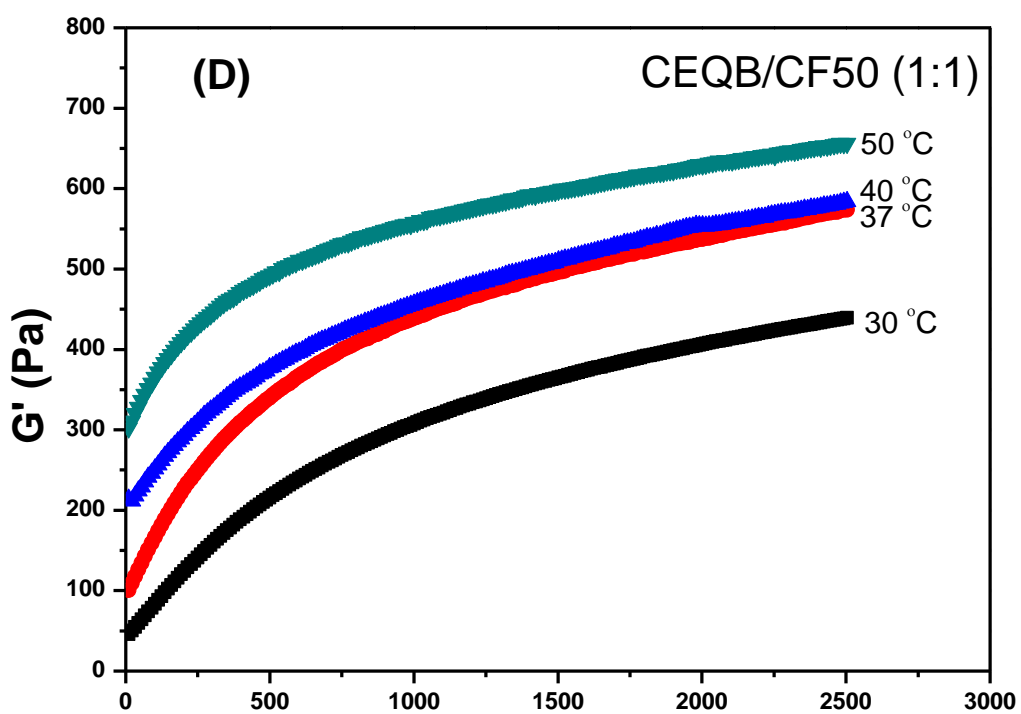
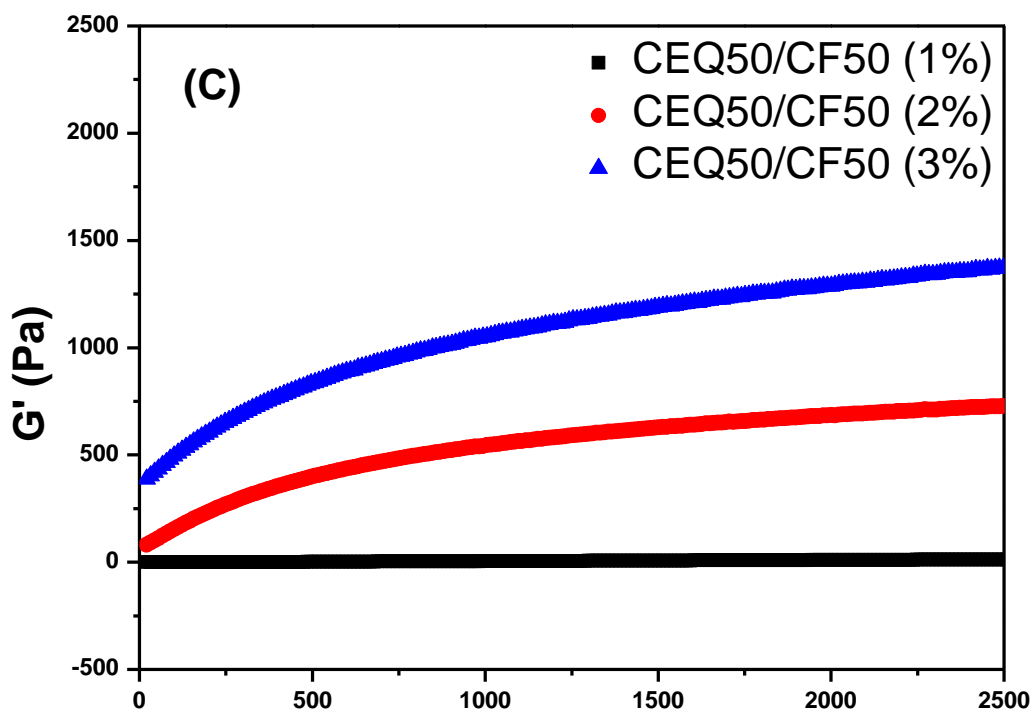
As análises reológicas foram realizadas variando os volumes do derivado oxidado (2% m/v) e CEQ (2% m/v) nas razões de 1:1; 1:4 e 4:1 (v/v) (Figura 26A e 26B). Os resultados mostram que o hidrogel com maior caráter elástico é aquele formado por quantidades equivalentes (v/v) do derivado oxidado e CEQ. Isso pode ser explicado pela razão molar, que é cerca de 1:1. Obtendo-se assim um hidrogel com menor tempo de geleificação e maior módulo de armazenamento (G'). A partir desta análise, a razão de 1:1 (v/v) foi escolhida para os demais experimentos.

Quando o comportamento reológico é avaliado em função da concentração das soluções de polissacarídeos (Figura 26C) observa-se que, à medida que a concentração aumenta o valor de G' também aumenta, porém com o aumento da concentração, tanto os CEQ quanto os derivados oxidados, diminuem sua solubilidade, dificultando assim a mistura das duas soluções para formação do hidrogel. Dentre as amostras estudadas, as soluções de concentração 2% m/v foi a que apresentou melhor solubilidade e um valor alto pelo módulo de armazenamento, sendo essa escolhida para os demais testes.

A Figura 26D apresenta o efeito da temperatura na geleificação. Observa-se que, à medida que a temperatura aumenta mais forte é o gel formado, ou seja, apresenta maior valor de G' . Provavelmente, isso se deve ao aumento do movimento molecular, aumentando probabilidade de colisão entre moléculas, facilitando as interações moleculares para formação da base de Schiff entre a CFO e CEQ. Resultados similares foram encontrados para hidrogéis formados a partir de dextrana oxidada/N-carboxietilquitosana e dextrana oxidada/quitina quartenizada (Weng; Chen; Chen, 2007; Xu; Zhang; Cai, 2019).

Figura 26- Variação do módulo de armazenamento (G') em função do tempo para os hidrogéis CEQB/CF50 (A) e CEQA/CF50 (B) em diferentes proporções. Variação do módulo de armazenamento (G') do tempo para o hidrogel CEQ50/CF50 variando a concentração das soluções (C). Módulo de armazenamento (G') em função do tempo para CEQB/CF50 (2%) (proporção de 1:1) a diferentes temperaturas (D).





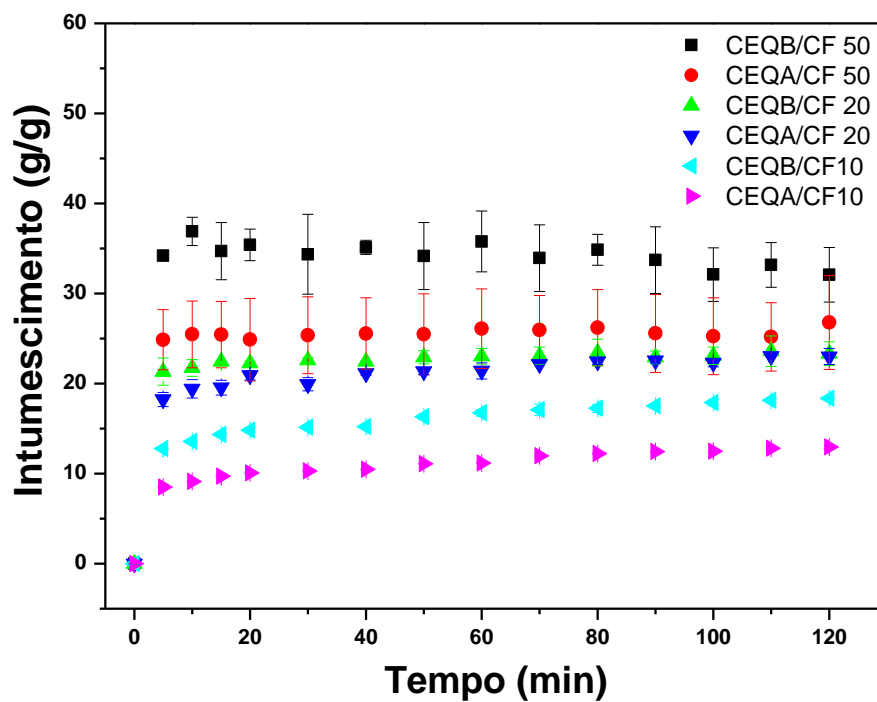
Fonte: Dados da pesquisa

Tempo (s)

4.2.8 Análise de intumescimento

O grau de intumescimento é um parâmetro importante, pois se relaciona com a eficiência da transferência de oxigênio e nutrientes nos *scaffolds* quando aplicados na regeneração de tecidos. Observa-se que os hidrogéis apresentaram comportamento semelhante quanto à capacidade de intumescimento (Figura 27). Todos apresentam intumescimento praticamente constante durante o intervalo de tempo analisado.

Figura 27 - Intumescimento dos *scaffolds* (CECA/CF10; CECA/CF20; CECA/CF50; CECB/CF10; CECB/CF20 e CECB/CF50) em solução tampão de PBS ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,4) a temperatura ambiente ($26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) por um período de 2 horas Intumescimento dos *scaffolds*.



Fonte: Dados da pesquisa

A taxa de intumescimento aumenta rapidamente e, em seguida atinge o equilíbrio em menos de 1 hora. Todos os *scaffolds* apresentaram alta capacidade de intumescimento que variaram de $12,95 \pm 0,17$ para CEQA/CF10 a $32,07 \pm 3,0$ para CEQB/CF50. A análise é relevante, pois permite avaliar o comportamento do material em meio aquoso. A quantidade e o perfil do intumescimento dos hidrogéis influenciam

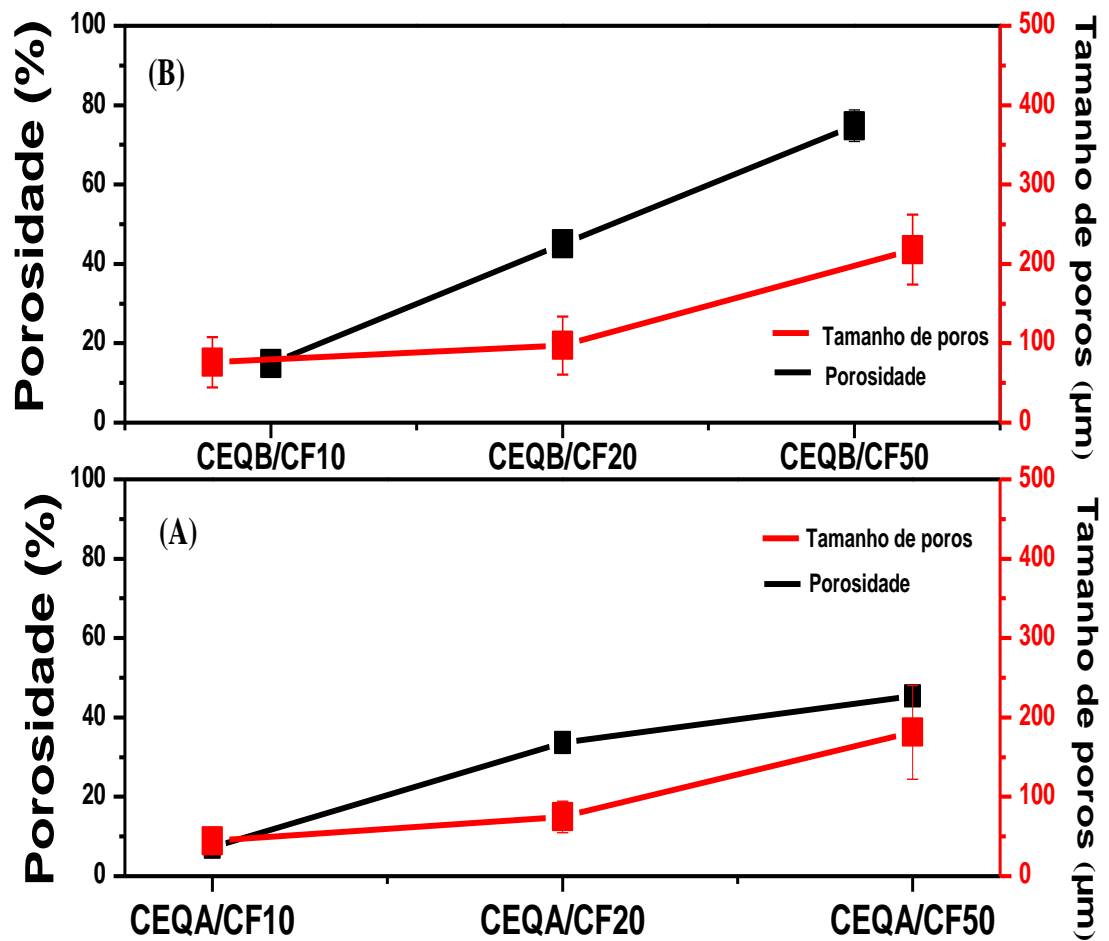
as propriedades dos *scaffolds*, como permeabilidade à água, difusão de solutos, taxa de degradação entre outros. Portanto, o conhecimento das características de intumescência dos hidrogéis é muito importante para aplicações da engenharia de tecidos (Sivashankari; Prabakaran, 2020).

O *scaffold* que apresentou maior taxa de intumescimento foi o CEQB/CF50, formado a partir da galactomanana com o maior grau de oxidação. Esse resultado é oposto ao que normalmente é observado nos hidrogéis, pois de uma maneira geral o aumento do grau de reticulação entre os polímeros origina uma rede mais densa e menos permeável. No entanto, os dados de porosidade e tamanho de poro mostram o aumento da porosidade e tamanho de poro para a combinação CEQB/CF50, o que justifica maior intumescimento. Resultado semelhante foi observado para *scaffolds* de carboxietilquitosana e goma do cajueiro oxidada (Carlos *et al.*, 2021) e para hidrogéis de goma arábica com colágeno (Rekulapally *et al.*, 2021). Uma explicação para esses dados é que com o aumento das ligações cruzadas entre os grupos dialdeído e os grupos amina do CEQ, a rede se torne mais ordenada ao longo de todo o gel, aumentando a interconectividade entre os poros, e conseqüentemente, absorvendo maior quantidade de líquidos (Cai, Kaiyong *et al.*, 2007).

4.2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura, porosidade e tamanho de poros

Porosidade é definida como a porcentagem de espaços vazios em um sólido (Karageorgiou; Kaplan, 2005). A porosidade é um parâmetro importante na engenharia de tecido, pois é através dos poros que ocorre a proliferação celular, além do transporte de nutrientes e metabólitos. A Figura 28 mostra o resultado da porosidade dos *scaffolds* CEQA/CF10, CEQA/CF20, CEQA/CF50, CEQB/CF10, CEQB/CF20 e CEQB/CF50. Através da análise, foi possível observar que, à medida que se aumenta o grau de oxidação maior será a porosidade do material. O *scaffolds* mais poroso foi o CEQB/CF50 apresentando porosidade em torno de 76%, enquanto CEQA/CF10 apresentou somente 9% de porosidade. Assim como no intumescimento a porosidade foi proporcional ao grau de oxidação e quantidades maiores de aminas livres. Rekulapally *et al.*, (2021) também encontraram resultados semelhantes para goma arábica oxidada e colágeno.

Figura 28 - Porosidade e tamanho de poros dos *scaffolds* (A) CEQB/CF10; CEQB/CF20; CEQB/CF50 e (B) CEQA/CF10; CEQA/CF20; CEQA/CF50

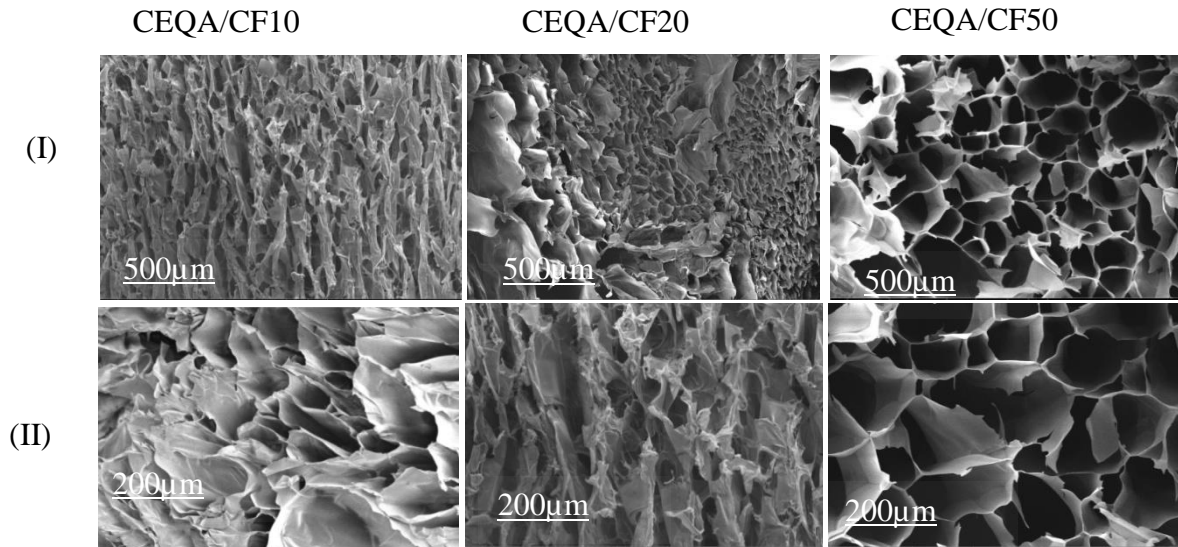


Fonte: Dados da pesquisa

As microestruturas dos *scaffolds* foram avaliadas por análise de MEV. As imagens foram tiradas de um corte transversal de cada uma das amostras. As imagens (Figura 29 e 30) mostram que os *scaffolds* apresentam uma estrutura tridimensional em rede porosa e irregular, variando o diâmetro dos poros em média de $55 \pm 25 \mu\text{m}$ (CEQA/CF10) a $204 \pm 142 \mu\text{m}$ para CEQA/CF50 (Figura 28). Outro fator importante utilizado na caracterização de uma estrutura porosa é a distribuição do tamanho dos poros, pois é um dos fatores que influenciam diretamente no crescimento do tecido. A heterogeneidade dos *scaffolds* pode influenciar seu desempenho, porque poros menores auxiliam no transporte de nutrientes, já os maiores promovem a migração celular, além da incorporação de vasos sanguíneos (Rasoulianboroujeni *et al.*, 2018). Os histogramas da distribuição de tamanho, equipados com funções de distribuição normal (Figura 31), fornecem uma visão precisa sobre os tamanhos

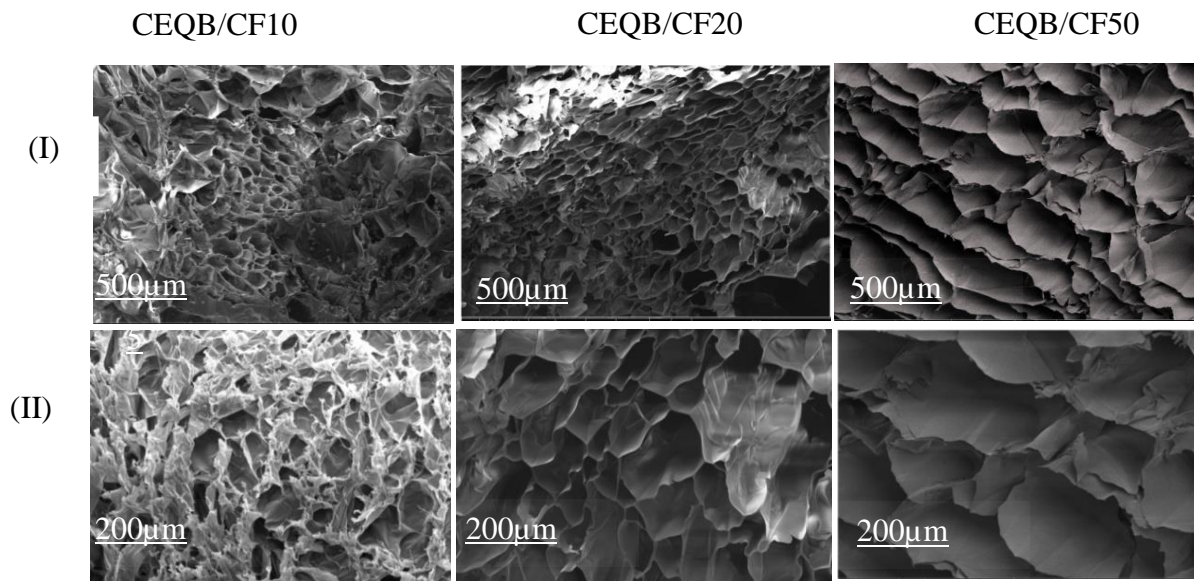
médios e a dispersão dos tamanhos dos poros. Pode-se ver que os diâmetros médios dos poros aumentam significativamente, além de uma maior heterogeneidade, com o aumento do grau de oxidação.

Figura 29 - Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras CEQA/CF10; CEQA/CF20; CEQA/CF50. A linha I mostra as imagens com magnificação em 500x e a linha II em 200x.



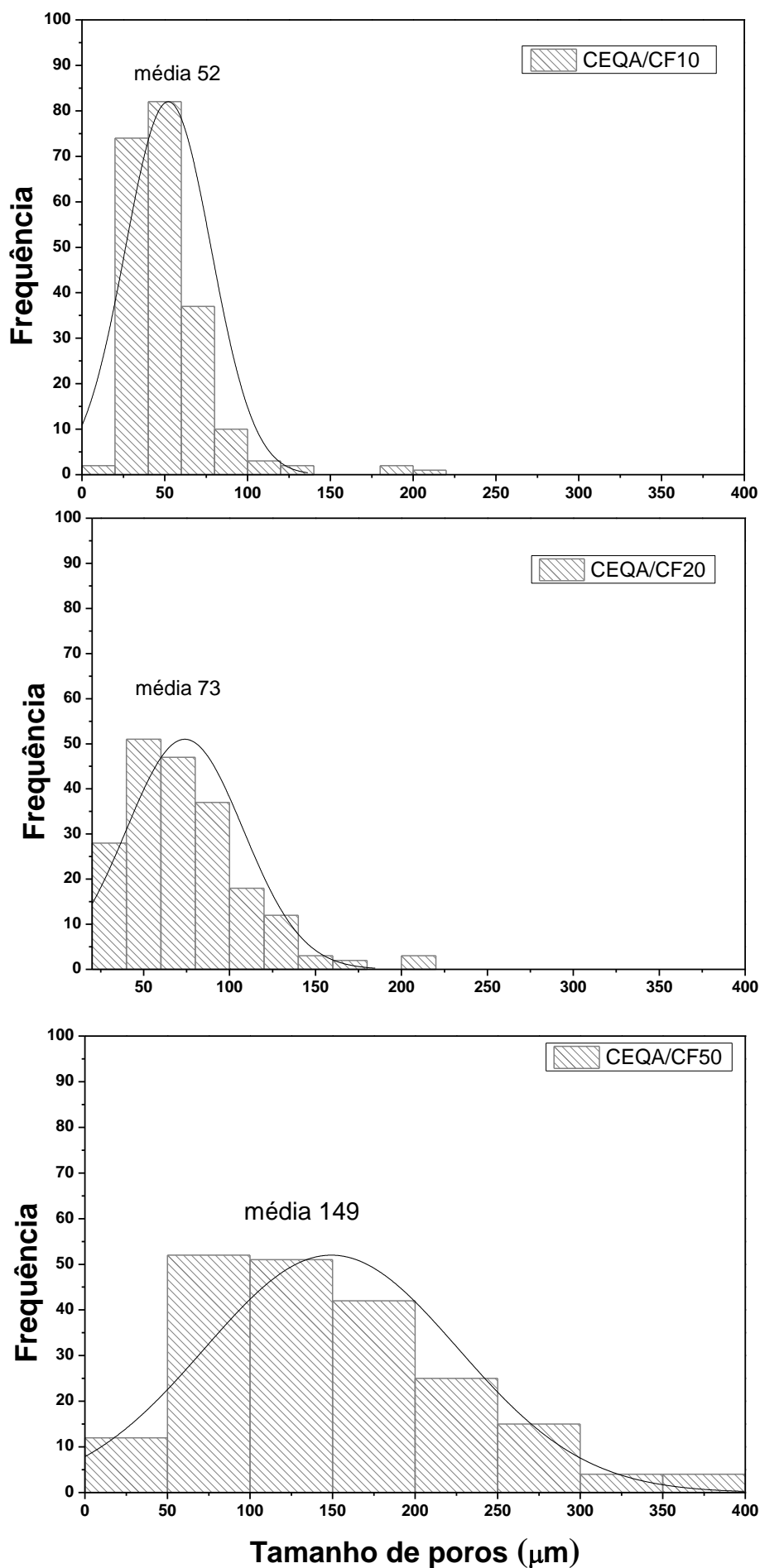
Fonte: Dados da pesquisa

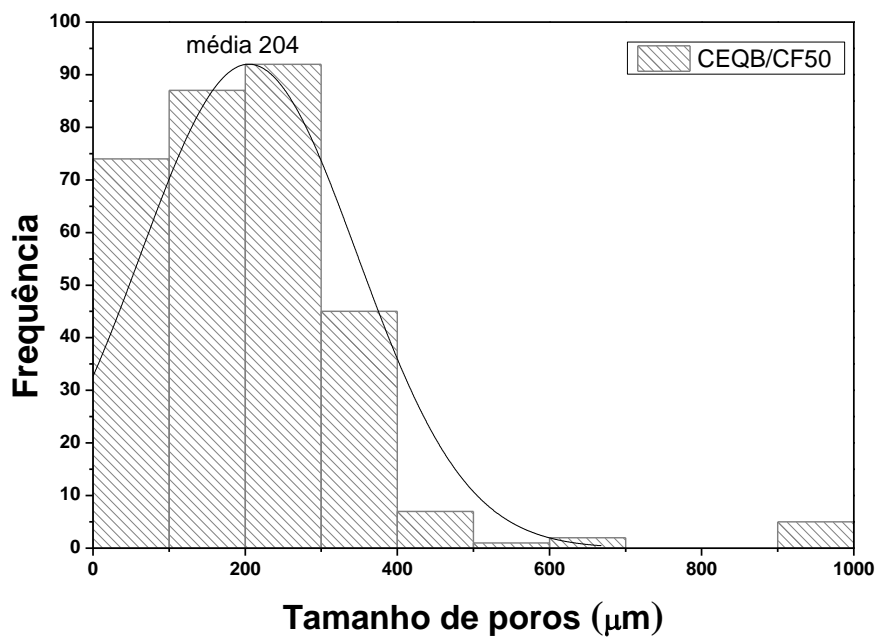
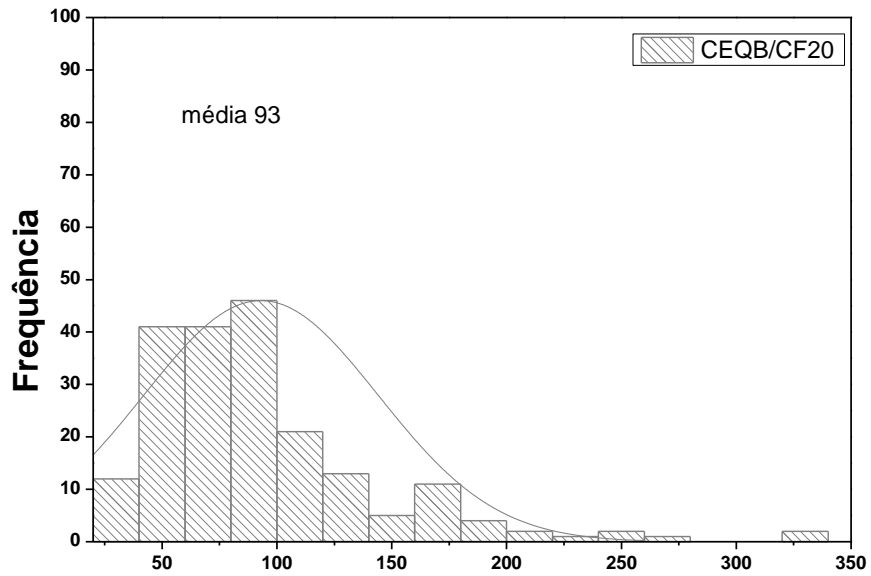
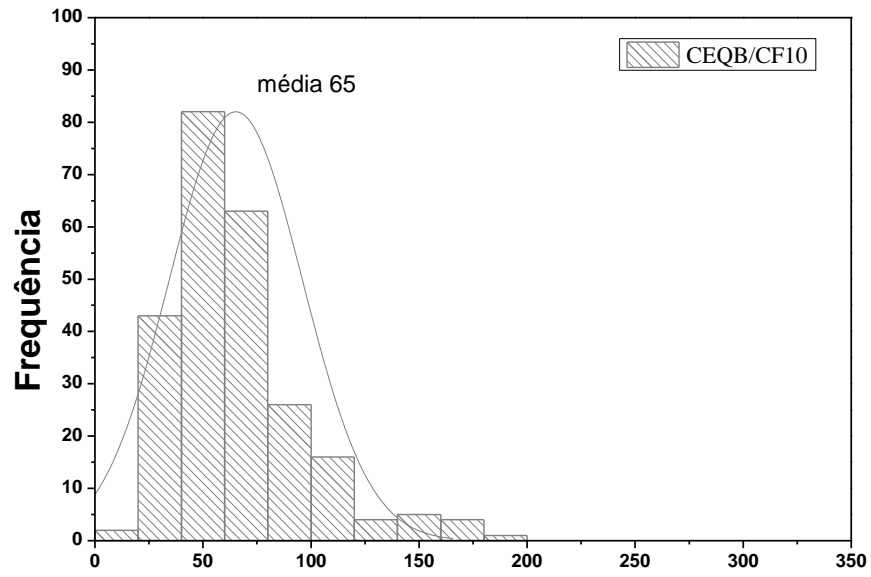
Figura 30 - Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras CEQB/CF10; CEQB/CF20; CEQB/CF50 dos *scaffolds*. A coluna I mostra as imagens com magnificação em 500x e a coluna II em 200x.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 31- Histogramas das curvas de distribuição dos tamanhos de poros dos scaffolds.





Fonte: Dados da pesquisa

Para o desenvolvimento celular em uma matrix, cada tecido requer uma distribuição de tamanho de poro específica. A distribuição do tamanho de poros e as interconexões entre eles variam em função do tamanho das células e das propriedades mecânicas requeridas do local do implante (Sarazin; Roy; Favis, 2004). Para angiogênese, por exemplo, o tamanho de poros relatado para desenvolvimento de células endoteliais e formação de vasos sanguíneos devem ser acima de 5 a 300 μm (Hozumi *et al.*, 2018). Para o crescimento de fibroblastos e hepatócito, os tamanhos de poros próximos a 20 μm seriam necessários. Já para a regeneração da pele, o tamanho de poros seria entre 50-150 μm e na faixa entre 100-150 μm seriam os ideais para regeneração óssea. Além disso, foi relatado que um tamanho de poro de 5 a 150 μm seria adequado para desenvolvimento de células hospedeiras (Hozumi *et al.*, 2018). Para o desenvolvimento de tecido ósseo não vascularizado, o tamanho adequado seria maior que 300 μm (Karageorgiou; Kaplan, 2005). Com base nessas informações, os *scaffolds* obtidos neste trabalho poderiam ser utilizados em diversas finalidades, já que é possível obter tamanhos de poros relativamente controlados variando-se as proporções dos materiais utilizados.

4.2.10 Análise Mecânica

As propriedades mecânicas dos biomateriais são importantes, pois se relacionam com o desenvolvimento de materiais que devem mimetizar a matriz extracelular para manter a proliferação, migração e diferenciação celular. Os *scaffolds* devem possuir resistência mecânica suficiente para suportar a carga biomecânica e fornecer suporte temporário para as células (Xu; Zhang; Cai, 2019). Na Figura 32 encontra-se a imagem do corpo de prova no início do ensaio de compressão do *scaffold* intumescido em tampão PBS (0,1 mol L⁻¹; pH 7,4).

Figura 32- Teste de compressão do *scaffold* (CEQA/CF20) intumescido em tampão PBS (0,1 mol L⁻¹; pH 7,4). Ensaio realizado a 37 °C.

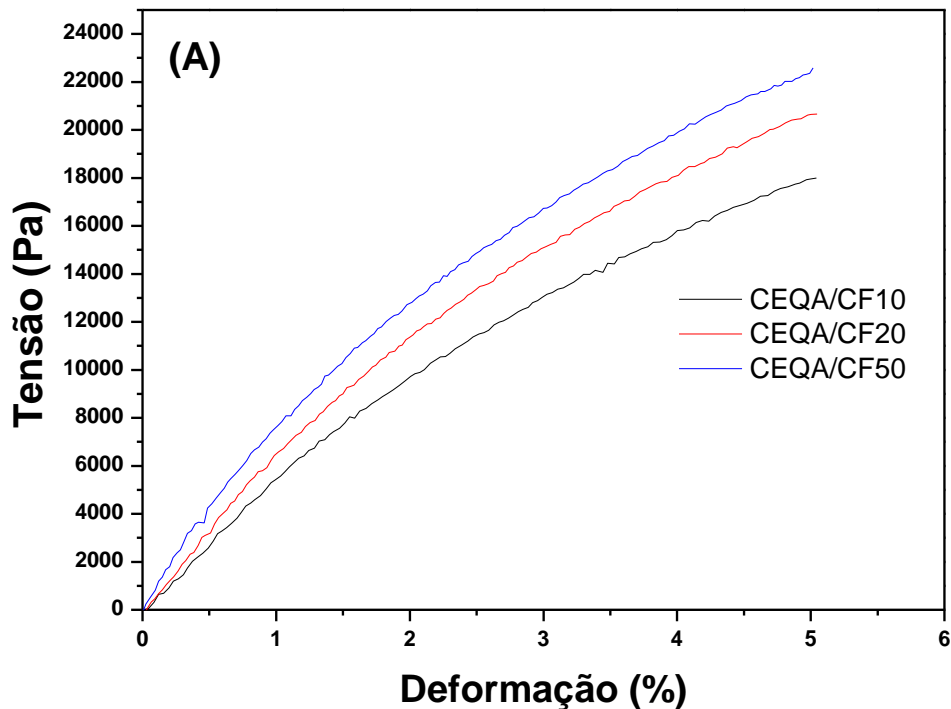


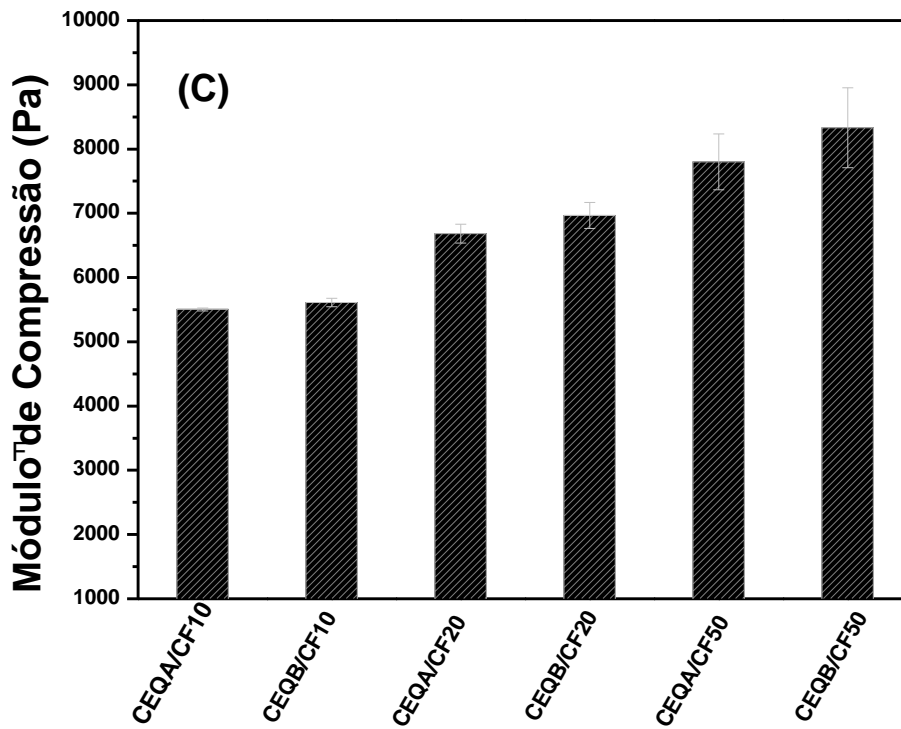
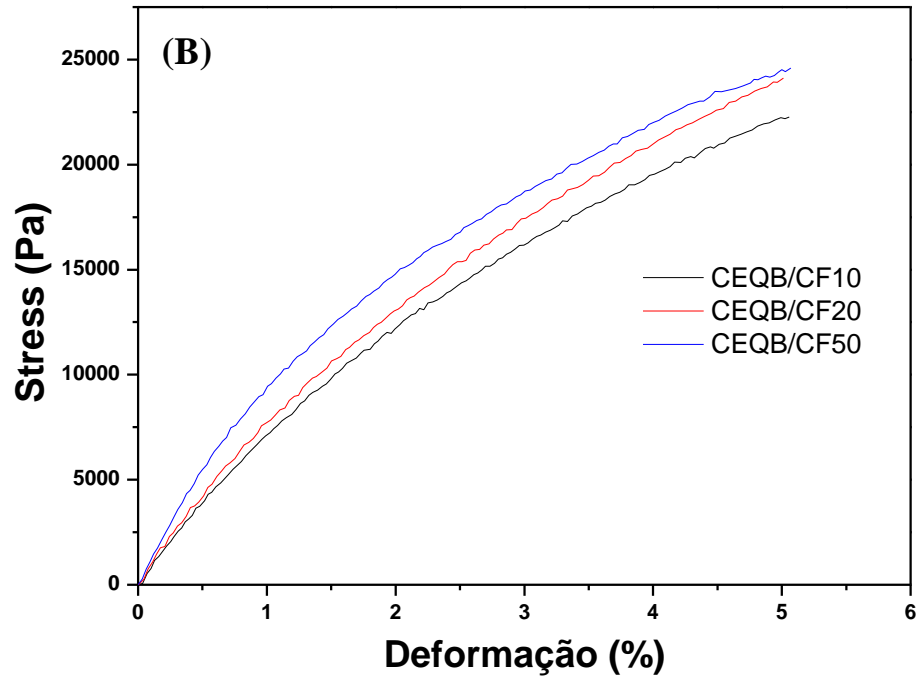
Fonte: elaborada pela autora

Conforme ilustrado na Figura 33, o *scaffold* CEQB/CF50 apresentou maior resistência à deformação em relação às demais amostras. Essa rigidez diz respeito ao aumento do grau de oxidação. Conseqüentemente o aumento do número de reticulações induz a um aprimoramento nas propriedades mecânicas, apresentando maiores valores de E' quando comparado aos *scaffolds* com menores graus de oxidação. O aumento de grupos aldeídicos provocou um aumento no efeito do comportamento tensão-deformação e módulo de compressão, mostrando que os grupamentos interagiram eficientemente com a matriz conferindo-lhes uma estrutura

mais rígida (Yu, Feng *et al.*, 2014). Como é possível observar na Figura 33C os valores de módulos de compressão (E') passaram de 5,5 kPa para os *scaffolds* de CEQA/CF10 chegando a 8,3 kPa para os *scaffolds* de CEQB/CF50. Esse aumento é atribuído ao maior grau de reticulação incorporado pelos grupos amino e carbonílicos presentes. De acordo com Barnes; Przybyla; Weaver, (2017), com esses valores de módulos de compressão, os *scaffolds* apresentados neste trabalho poderiam ser utilizados para o desenvolvimento celular de tecidos moles, já que os valores de E' para tecidos do corpo humano variam de $E' \leq 4 \times 10^2$ Pa para tecidos moles como pulmão e cérebro; $E' \geq 10^4$ Pa para tecidos intermediários como músculos e $E' \geq 10^9$ Pa para tecidos mais rígidos como dentes.

Figura 33. Curva de tensão-deformação (A e B) e módulo de compressão (C) dos *scaffolds* liofilizados e intumescidos em tampão PBS ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,4), experimento realizado a $37 \text{ }^\circ\text{C}$





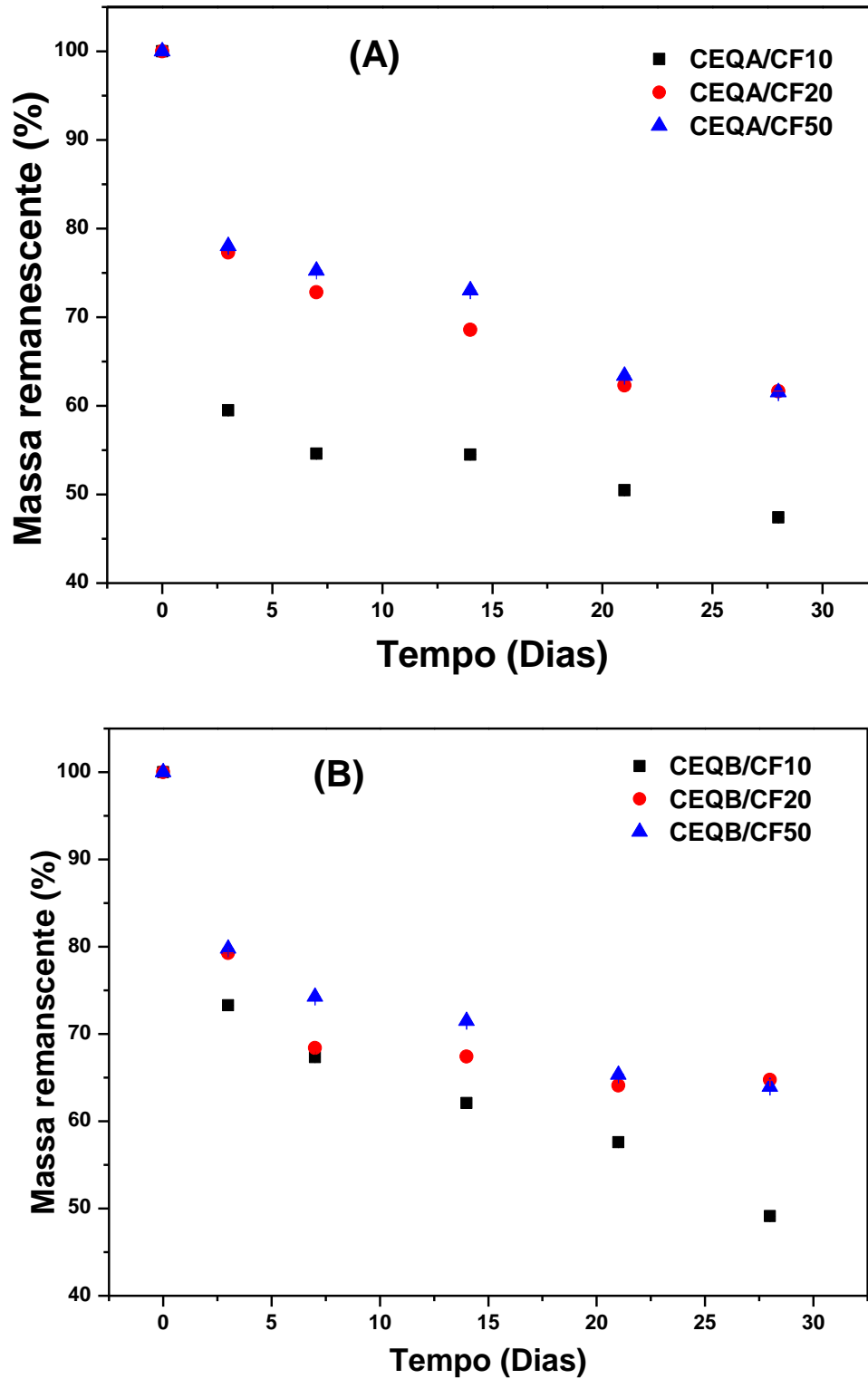
Fonte: Dados da pesquisa

4.2.11 Teste de degradação

Para utilização de *scaffolds*, um dos principais requisitos é que esse material seja biodegradável e com taxa de degradação controlável, pois à medida que o novo tecido começa a se formar é necessário que haja espaço para o crescimento, proliferação e migração. O *scaffold* ideal deve degradar-se à medida que o novo tecido é formado, pois a remodelação do novo tecido será interferida pela degradação do mesmo (Chang *et al.*, 2017). Na cicatrização de feridas, por exemplo, o tempo necessário para formação do novo tecido envolve as etapas de inflamação, proliferação e maturação que geralmente termina entre 10 a 30 dias (Ramli; Fhong Soon; Mohd Rus, 2016; Sinno; Prakash, 2013). Portanto, os *scaffolds* tanto para esta utilização como para outras devem degradar-se no período adequado,

Na Figura 34A e 34B são apresentadas as taxas de degradação dos *scaffolds* preparados. Os géis formados por CEQA/CF10 perderam 65% da massa em 28 dias, já os formados por CEQB/CF50 perderam apenas 36% de sua massa no mesmo período. Esse fato pode ser explicado pelo grau de reticulação, quanto maior a reticulação, maior a possibilidade de formação de base de Schiff, o que dificulta a degradação do material. Quanto maior o número de ligações, maior será o tempo para que ocorra a hidrólise dessas ligações. Os *scaffolds* formados por CEQA se degradam mais rápido que os formados por CEQB (Yang *et al.*, 2016). Esse comportamento pode ser justificado pela presença em CEQA de um maior número de grupos carboxilato que em CEQB, o que o tornará mais solúvel em meio aquoso e com pH acima de 7,0. Dessa forma, é possível moldar a taxa de degradação do material de acordo com a necessidade do biomaterial a ser utilizado.

Figura 34 – Curvas de degradação *in vitro* para os *scaffolds* de CEQA (A) e CEQB (B), em tampão PBS (0,1 mol L⁻¹; pH 7,4) experimento realizado a 37 °C.

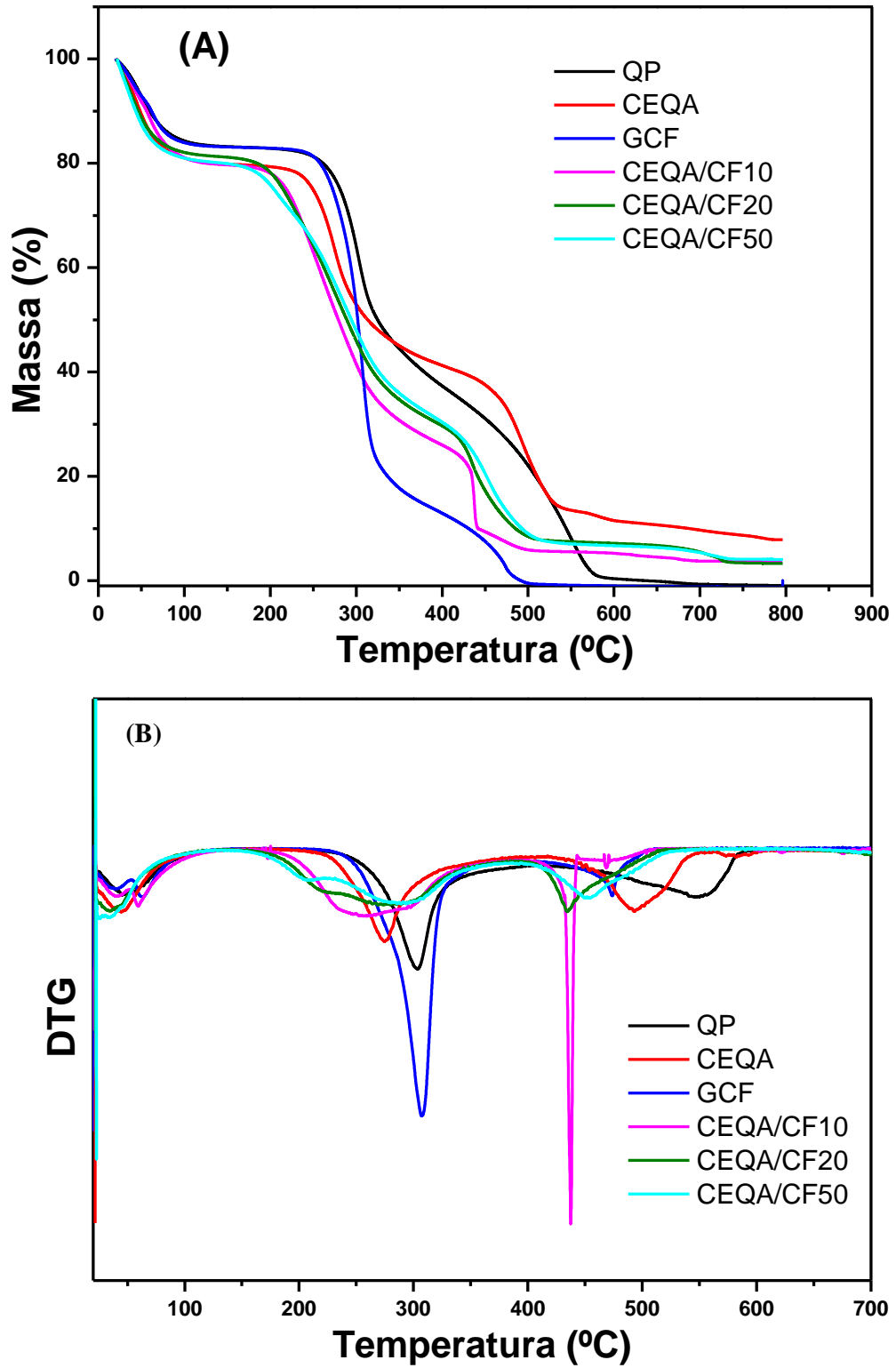


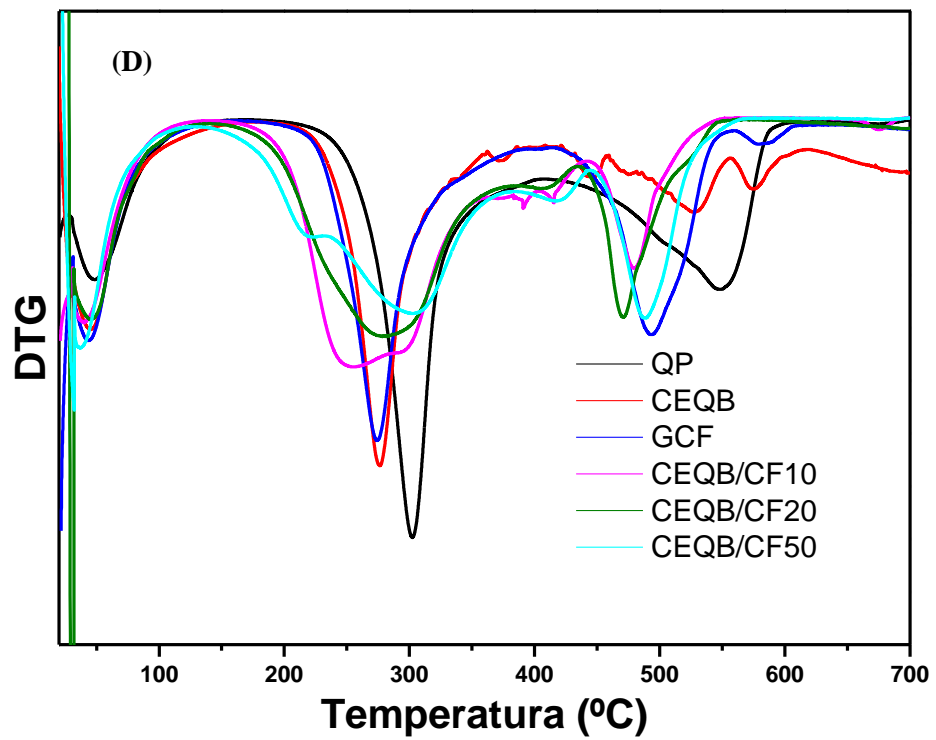
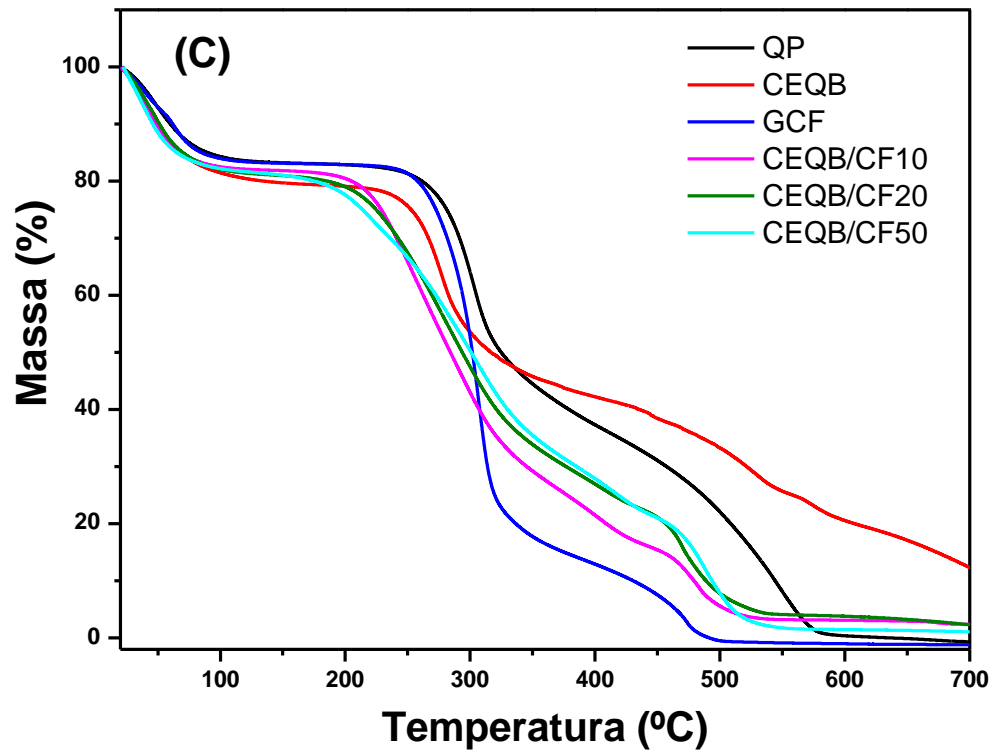
Fonte: dados da pesquisa

4.2.12 *Análise termogravimétrica*

A Figura 35 mostra as curvas de degradação térmica das amostras de quitosana purificada (QP), GCF, CEQA, CEQB e dos *scaffolds* formados. Todas as curvas apresentaram 3 eventos térmicos. O primeiro evento ocorre antes de 100 °C e se refere à perda de umidade dos materiais, além de água ligada a estrutura dos materiais. O segundo evento, localizado entre 210 e 309 °C, se referem à perda de massa dos materiais, onde ocorrem as primeiras cisões das ligações químicas. Com o processo de oxidação, as galactomananas sofrem degradação das cadeias poliméricas, o que reduz sua massa molar. Por essa razão, os géis obtidos dos derivados oxidados apresentam menores temperaturas de degradação. Quando comparados a QP com CEQA e CEQB, os derivados carboxetilados são menos estáveis termicamente devido à presença de grupos carboxetil. Esses grupos impedem a formação de ligações de hidrogênio inter e intramolecular devido ao impedimento estérico (Ibrahim; Mostafa; Kandile, 2020). No final do segundo evento os géis perderam em torno de 75% de sua massa. O terceiro evento (420 °C - 600 °C) está relacionado à matéria orgânica mais resistente à degradação, deslocando a degradação do material para temperaturas mais altas. A quantidade de material degradado nesta etapa foi de 22% para QP; 11% para GCF; 15% para CEQA e entre 20 e 22% para os *scaffolds*.

Figura 35– Curvas de análises termogravimétricas (A e C) e DTG (B e C) das amostras QP; GCF; CEQA; CEQB e os *scaffolds*, realizados em atmosfera de ar sintético.





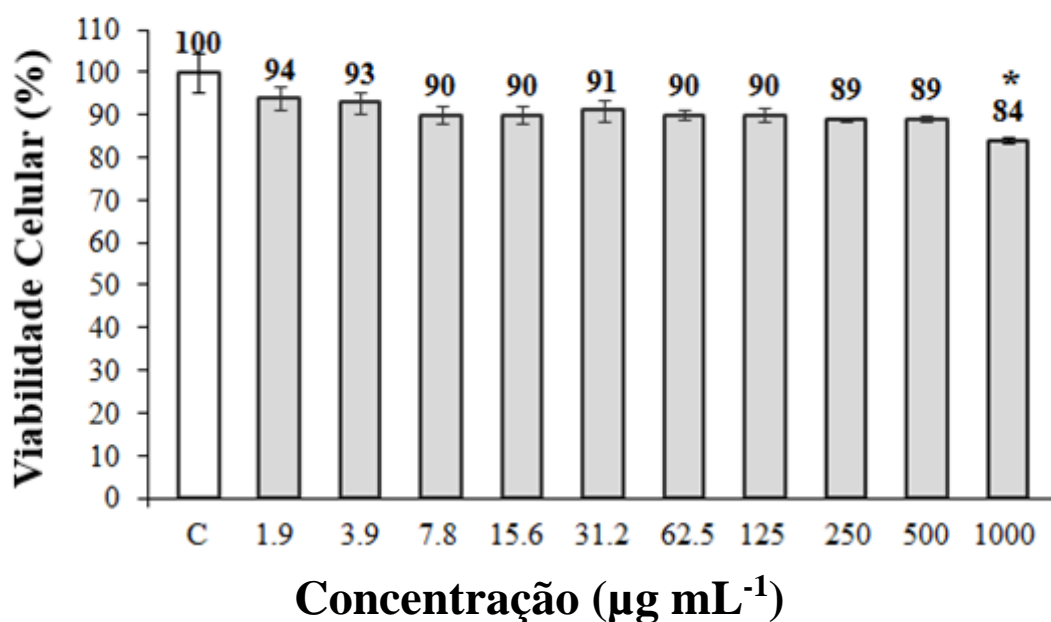
Fonte: Dados da pesquisa

4.2.13 Citotoxicidade da galactomanana da *Cassia fistula*

A galactomanana da *Cassia fistula* não reduziu significativamente a viabilidade das células em até $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ pelo método MTT (Figura 36), diminuindo-a em 16% na concentração máxima testada de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e apresentando assim um $\text{CC}_{50} > 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esse baixo valor de citotoxicidade em células está de acordo com os já relatados para outras galactomananas nativas extraídas das sementes da leguminosa *Dimorphandra gardneriana* (Moura Neto *et al.*, 2014) com $\text{CC}_{50} > 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, de *Mimosa scabrella* (Chrestani *et al.*, 2009) com um $\text{CC}_{50} > 645 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou de *Leucaena leucocephala* (Gemin *et al.*, 2010) com um $\text{CC}_{50} > 2500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Levando em consideração que as atividades biológicas relatadas para a *Cassia fistula* como a atividade antioxidante *in vitro* do extrato hidroalcoólico de suas flores (Bhalodia; Nariya; Shukla, 2011) foram observadas em concentrações abaixo de $39 \mu\text{g mL}^{-1}$, valores muito abaixo de CC_{50} . Os valores de EC_{50} reforçam uma possível baixa toxicidade se testados *in vivo*.

Figura 36– Avaliação da citotoxicidade da galactomanana da *Cassia fistula* em células após 72 horas de incubação a 37°C e 5% de CO_2 pelo ensaio de MTT. Controle: sem tratamento com polissacarídeo. As barras representam as médias, com as linhas verticais indicando os desvios padrão, $n = 3$, * $P < 0,01$

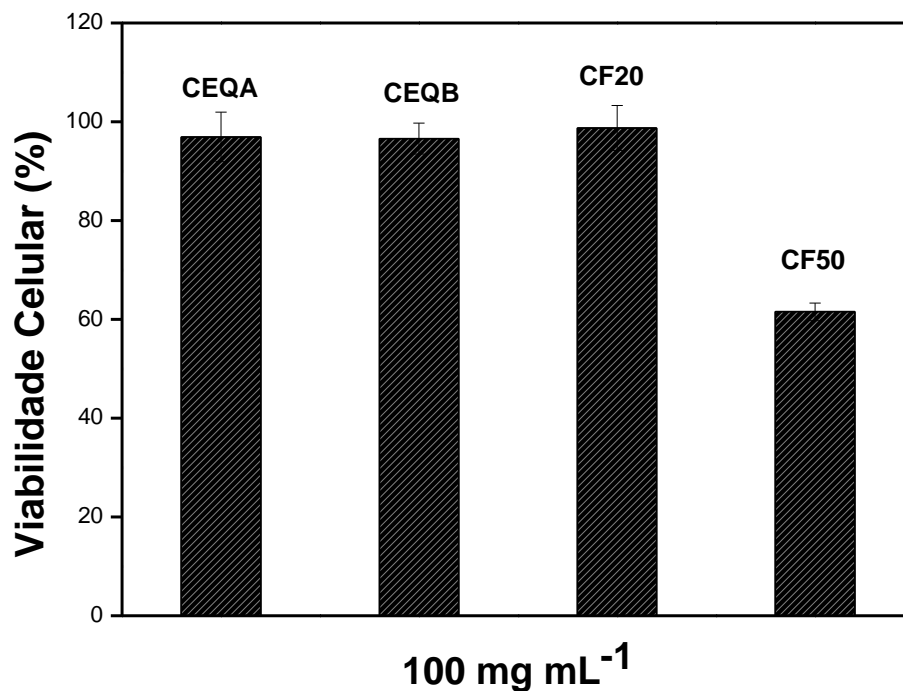


Fonte: Dados da pesquisa

4.2.14 Viabilidade Celular

A citotoxicidade é o ponto crucial da engenharia de tecidos. Os biomateriais produzidos devem proporcionar o desenvolvimento celular. Inicialmente, os testes de viabilidade celular foram realizados nos materiais precursores CEQA, CEQB, CF20 e CF50, a fim de avaliar sua citotoxicidade. Os resultados apresentados na Figura 37 mostram que os dois derivados carboxietilados não são citotóxicos permitindo um desenvolvimento celular superior a 90%. Em relação aos derivados oxidados a amostra CF20 também apresentou uma viabilidade celular maior que 90%. Já a amostra de CF50 apresentou valores médio de 63,5%, a redução da viabilidade se deve a uma maior quantidade de grupos aldeído livres reativos gerados durante o processo de oxidação. Esses grupos aldeído podem ter se ligado às proteínas através de grupos funcionais como as amins primárias, que são encontradas na membrana celular do sistema biológico. Essa ligação causa danos à membrana celular. A redução da massa molar é outro fator que afeta a viabilidade celular, pois quanto menor a cadeia, menor será a quantidade de grupos hidroxila disponíveis para interagir com os grupos aldeído, tornando-os livres. Resultados semelhantes foram encontrados por (Muhammad *et al.*, 2020).

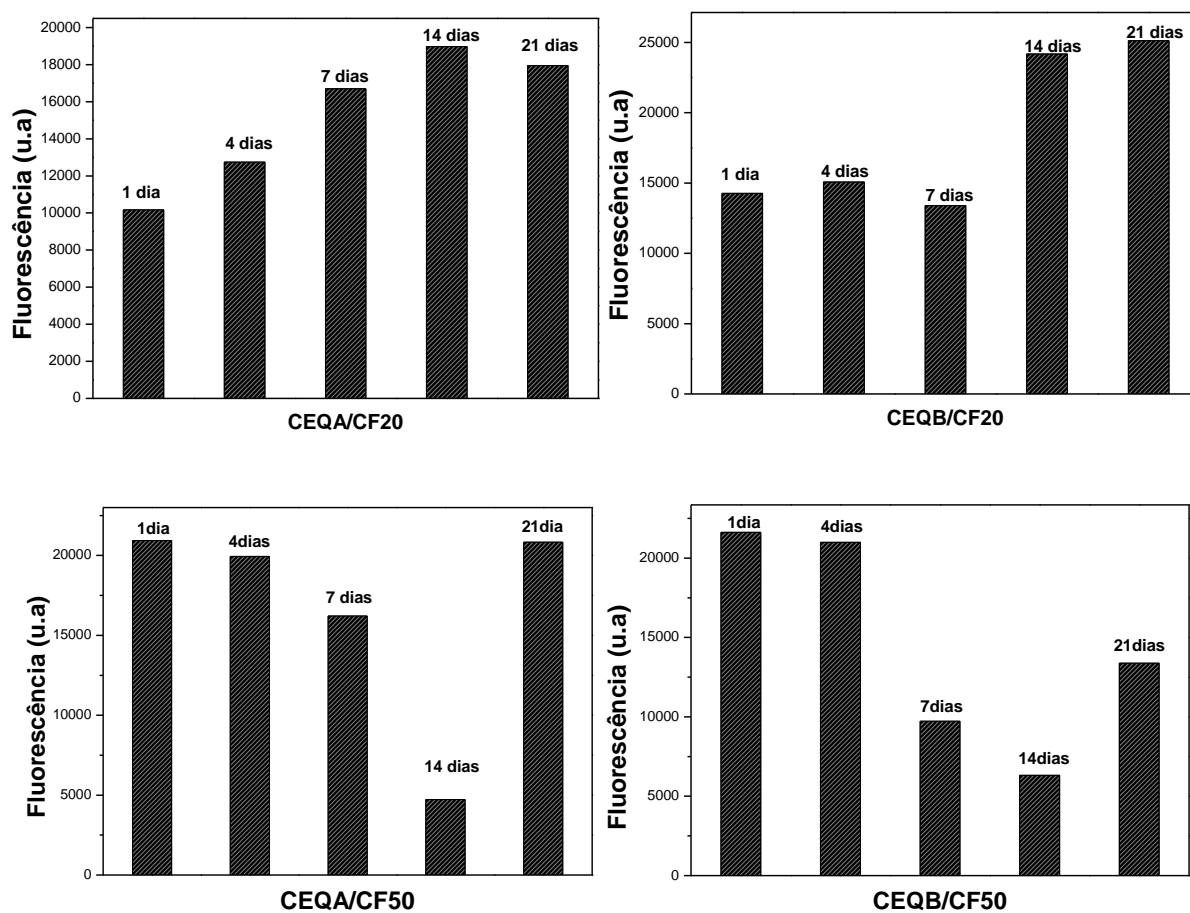
Figura 37 – Desenvolvimento celular para as amostras CEQA, CEQB, CF20 e CF50.



Fonte: Dados da pesquisa

A linhagem celular L929 foi utilizada para testar a capacidade de proliferação celular nos *scaffolds* (CEQA/CF20, CEQA/CF50, CEQB/CF20 e CEQB/CF50). Os ensaios foram realizados por um período de 20 dias nos *scaffolds* que apresentaram menores tempos de geleificação, maiores valores de módulo de elasticidade e maiores valores de módulo de compressão. Os *scaffolds* CEQA/CF10 e CEQB/CF10 apresentaram-se como hidrogéis pouco resistente, sendo descartado deste teste. A atividade metabólica celular das células semeadas nos *scaffolds* tridimensionais mostrou um comportamento estável ao longo dos 20 dias para os *scaffolds* que continham em sua formulação a CF20, indicando a fixação e o crescimento de células. Já os *scaffolds* com a CF50 apresentaram uma queda no desenvolvimento com um posterior aumento no vigésimo dia, o que demonstra que os *scaffolds* utilizados não apresentaram toxicidade. Além disso, a formulação com menor grau de oxidação (CF20) apresentou atividade metabólica significativamente maior logo após a semeadura das células, quando comparada aos *scaffolds* CEQA/CF50 e CEQB/CF50. Isso pode estar relacionado com um maior aprisionamento celular ou eficiência de adesão, o que pode estar relacionado às suas propriedades físico-químicas ou arquitetônicas (Figura 38).

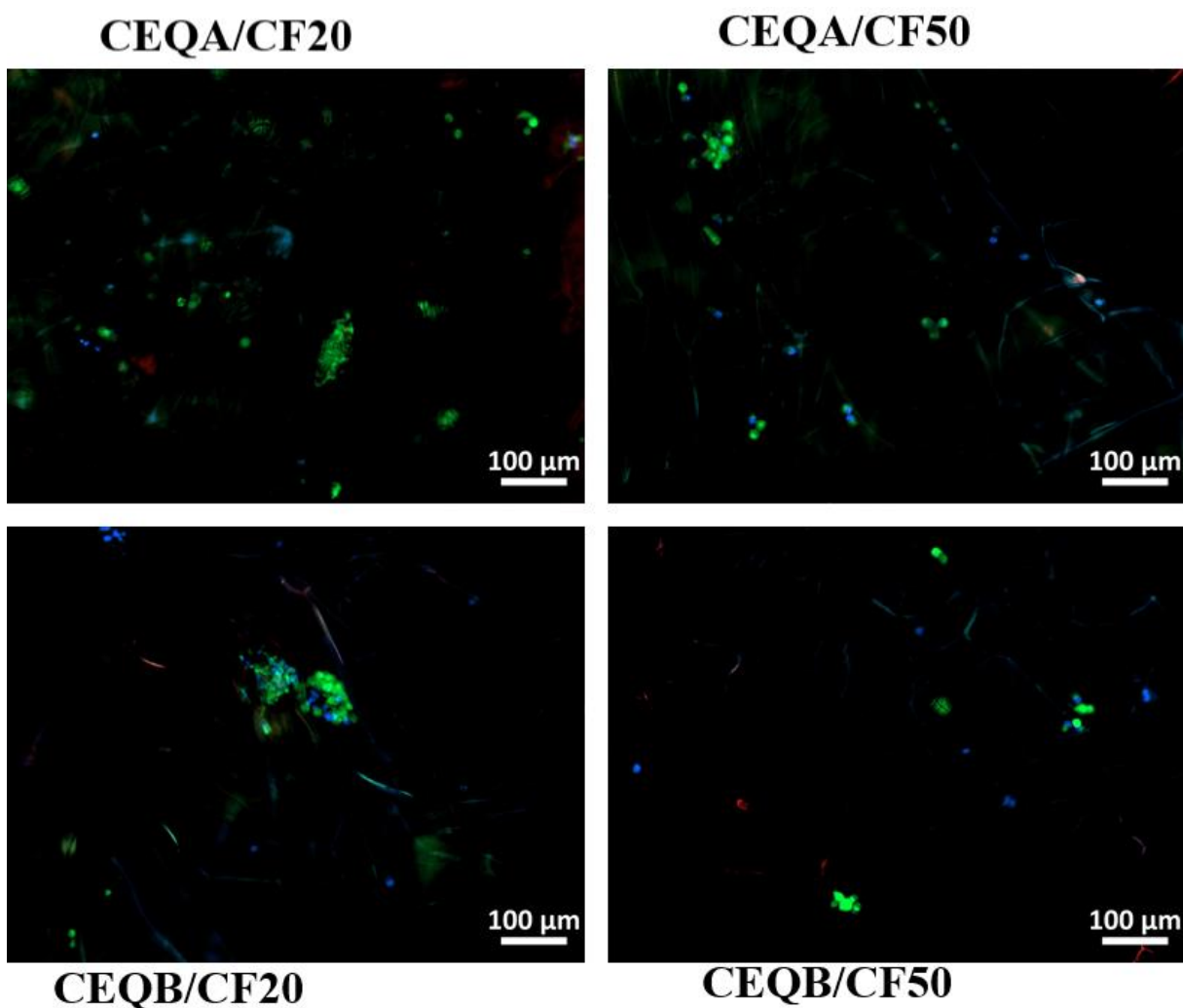
Figura 38 – Proliferação das células L929 nos *scaffolds* CEQA/CF20; CEQB/CF20; CEQA/CF50 e CEQB/CF50. As colunas representam os resultados para os dias 1, 4, 7, 14 e 21.



Fonte: Dados da pesquisa

A avaliação microscópica da viabilidade celular permitiu observar que, para todos os *scaffolds*, as células permaneceram viáveis em toda a profundidade dos *scaffolds*, após o período de 20 dias (Figura 39). A análise geral do perfil de atividade metabólica e viabilidade celular nos *scaffolds* indicaram que as formulações dos biomateriais estudadas não são citotóxicas.

Figura 39 - Ensaio de live/dead: imagens de microscopia de fluorescência de células L929 semeadas dentro dos *scaffolds* (CEQA/CF20, CEQB/CF20, CEQA/CF50 E CEQB/CF50) após 20 dias de incubação. As células vivas são coradas com calceína (verde) e as células mortas são marcadas com PI (vermelho), em azul são os núcleos celulares.



Fonte: Dados da pesquisa

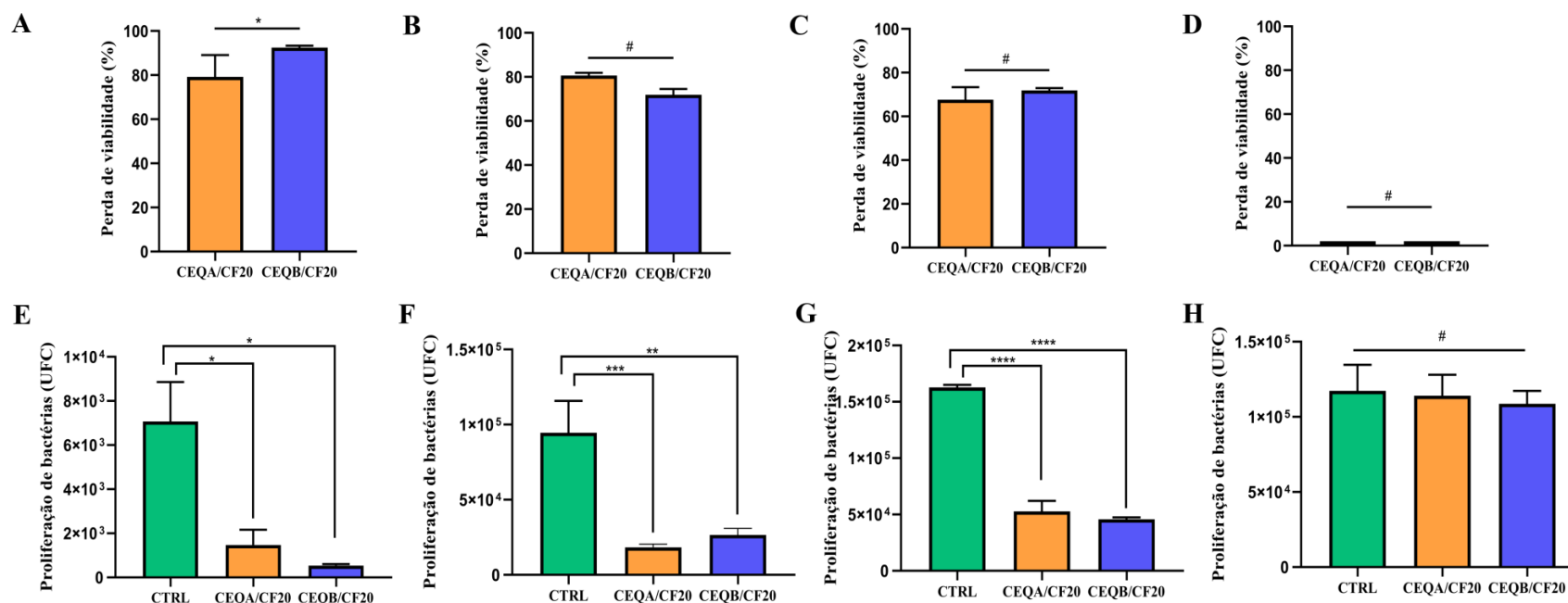
4.2.15 Avaliação do potencial antibacteriano *in vitro*

Para a utilização de *scaffolds* na regeneração da pele, uma das características importantes é a propriedade bactericida do material. Biomateriais poliméricos naturais têm mostrado maior resistência à infecção bacteriana do que biomateriais sintéticos (Brennan EP, Reing J, Chew D, Myers-Irvin JM, Young EJ, 2006). Os polímeros testados não apresentaram atividade inibitória (> 99%) frente aos micro-organismos testados, nas concentrações utilizadas. Portanto, não foi possível determinar Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada substância (Tabela 5). Os *scaffolds* mostraram um forte efeito inibitório contra as cepas Gram-positivas testadas, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, que são patógenos oportunistas causadores de várias infecções, como abscesso, miocardite, pneumonia, entre outras (Shivae et al., 2021). No entanto, não apresentaram atividade bactericida contra bactérias Gram-negativas, neste caso *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. A diferença pode ser explicada pelo fato de essas cepas apresentarem uma estrutura de parede celular bacteriana mais complexa do que as Gram-positivas, dificultando a ação antibacteriana dos *scaffolds* (Park; Chong, 2020). Os valores médios de perda de viabilidade bacteriana são mostrados nas Figuras 40 e 41. A maior suscetibilidade de bactérias Gram-positivas corrobora os achados de Ibrahim, et al. 2020, que estudou o efeito antibacteriano da carboxietilquitosana e demonstrou uma melhora no efeito bactericida em comparação à quitosana não modificada. Esse efeito foi atribuído aos grupos carregados negativamente (ânions carboxilato) e positivamente carregados (cátions amônio), grupos também presentes nos polímeros aqui estudados.

Tabela 5– Concentração Inibitória Mínima (CIM).

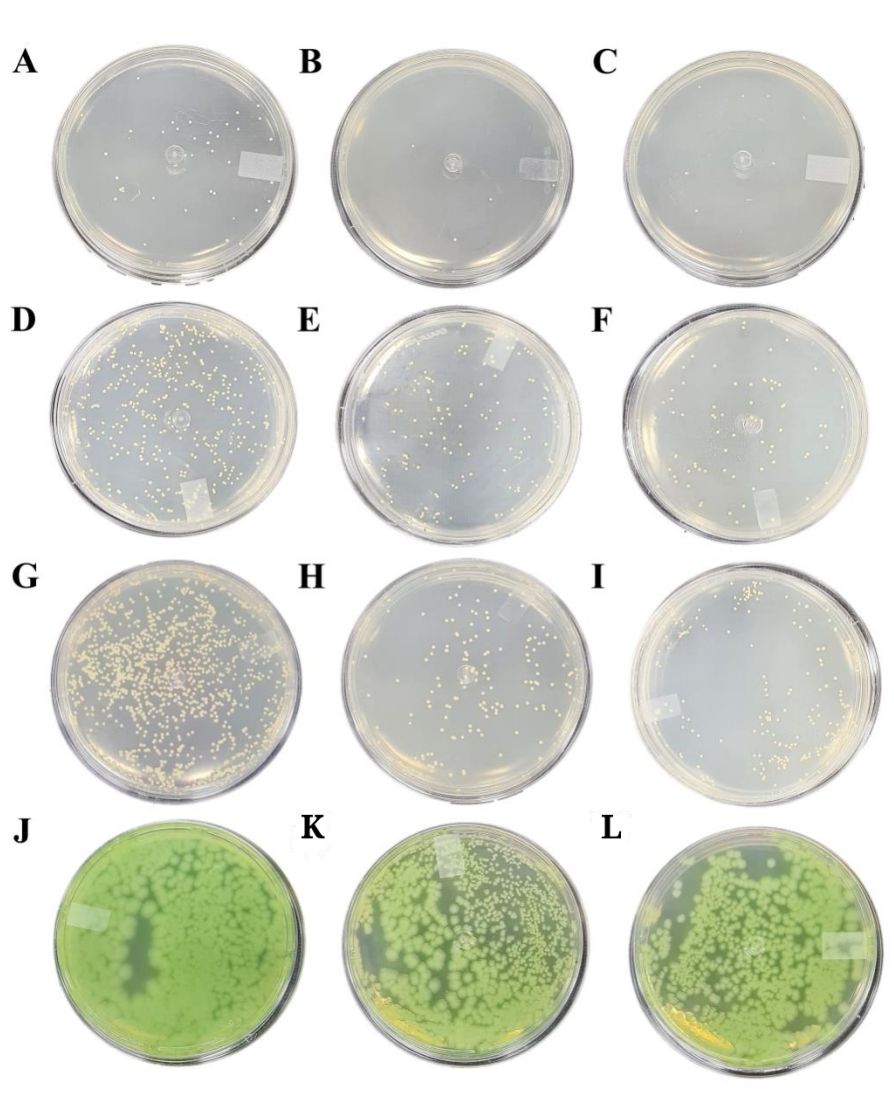
Bactérias	CEQA (mg mL ⁻¹)	CEQB (mg mL ⁻¹)	CF20(mg mL ⁻¹)
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	> 4	> 4	> 4
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	> 4	> 4	> 4
<i>S. aureus</i> ATCC 43300 - MRSA	> 4	> 4	> 4
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 4	> 4	> 4

Figura 40- Atividade antibacteriana dos *scaffolds* CEQA/CF20 e CEQB/CF20. **A, E)** *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; **B, F)** *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; **C, G)** *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 – MRSA; **D, H)** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Significância estatística: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Ausência de significância estatística: # $p > 0,05$. Os dados são apresentados como média \pm epm (n = 3). UFC: unidades formadoras de colônias bacterianas.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 41- Placas de Petri contendo bactérias não tratadas (controle) e bactérias tratadas com os *scaffolds* CEQA/CF20 e CEQB/CF20. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228: **A)** controle; **B)** tratada com CEQA/CF20; **C)** tratada com CEQB/CF20. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213: **D)** controle; **E)** tratada com CEQA/CF20; **F)** tratada com CEQB/CF20. *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 – MRSA: **G)** controle; **H)** tratada com CEQA/CF20; **I)** tratada com CEQB/CF20. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853: **J)** controle; **K)** tratada com CEQA/CF20; **L)** tratada com CEQB/CF20.



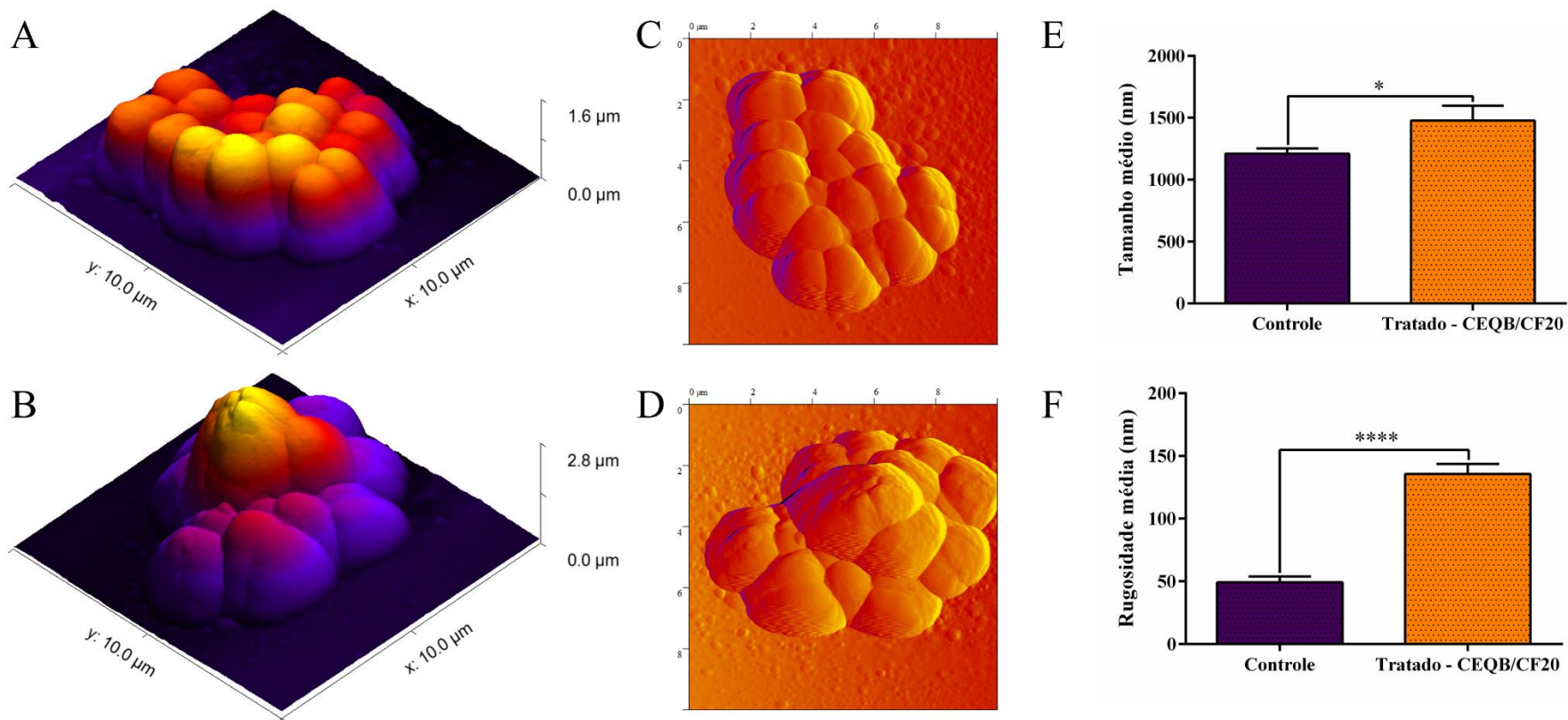
Fonte: Dados da pesquisa

4.2.16 Análise do efeito antibacteriano do scaffold CEQB/CF20 por microscopia de força atômica (MFA)

Após análise de MFA do tratamento da bactéria *Staphylococcus epidermidis* com o scaffold CEQB/CF20 (Figura 42) foi possível perceber que tal tratamento causou severas alterações morfológica nas células bacterianas. As Figuras 42A e 42C são referentes ao controle, onde não houve tratamento. A colônia apresenta morfologia padrão do gênero *Staphylococcus*, com células bem definidas, homogêneas e com um tamanho médio de 1212 ± 42 nm. Após o tratamento, sua morfologia sofreu alterações, relacionadas à forma e tamanho das células. O tamanho médio após o tratamento com CEQB/CF20, passou para 1477 ± 121 nm. Além de demonstrar completa desorganização celular, se refletindo também na medida de rugosidade média.

Na rugosidade média, permite-se verificar possíveis alterações na superfície da célula bacteriana. A medida demonstrou um aumento significativo da rugosidade na superfície celular, onde o grupo controle (não tratado) apresentou uma rugosidade média de $49,3 \pm 4,6$ nm e o grupo tratado (CEQB/CF20) passou para $135,6 \pm 8$ nm. O que destaca ainda mais a ação combinada de quitosana modificada e polímeros oxidados na composição do scaffold. Ambos têm forte interação com compostos da parede celular bacteriana. A partir do desequilíbrio osmótico, ocorrem alterações enzimáticas e de transporte seriais, causando danos irreversíveis e consequente morte celular (Cai, Zhao Sheng *et al.*, 2009; Ibrahim; Mostafa; Kandile, 2020; Zhu *et al.*, 2017).

Figura 42- Imagens 3D da bactéria *S. epidermidis* por MFA. Não tratada (A e C), tratamento com o *scaffold* CEQB/CF20 (B e D). Imagens com resolução de 512x512 pixels. Gráficos de tamanho e rugosidade média em E e F, respectivamente.



Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 6- Caracterização das diferentes propriedades dos hidrogéis de polissacarídeos modificados

PROPRIEDADES									
Amostra	Tempo de geleificação (s)	Tamanho de poros (µm)	Grau de intumescimento (g/g)	Módulo de perda (Pa)	Módulo compressivo (Pa)	Massa remanescente após 21 dias (%)	Viabilidade de celular	Perda de viabilidade bacteriana (%). <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	Perda de viabilidade bacteriana (%). <i>S. aureus</i> ATCC 29213
CEQA/CF10	158	52	13	60	5507	47	--	--	--
CEQB/CF10	143	65	18	200	5568	49	--	--	--
CEQA/CF20	63	74	23	499	6662	61	Ótima	79	80
CEQB/CF20	52	93	23	1653	6986	64	Ótima	92	71
CEQA/CF50	50	149	26	876	7815	61	Regular	--	--
CEQB/CF50	33	205	32	2333	8318	64	Regular	--	--

A Tabela 6 resume os resultados das análises obtidas neste trabalho. Após a coleta de todos os dados, é possível verificar que os *scaffolds* CEQA/CF20 e CEQB/CF20 foram os que apresentaram os resultados mais promissores para a preparação de biomateriais para engenharia de tecidos. Nesse contexto, os *scaffolds* CEQA/CF20 e CEQB/CF20 poderiam ser utilizados, por exemplo, na restauração de pele, pois possuem porosidade adequada (50-150 μm), valores adequados de módulo de compressão e excelente viabilidade celular. Apresentam ainda, atividade antibacteriana superior a 90%, para as bactérias *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 que faz parte da nossa flora presente na nossa pele. No entanto, são patógenos oportunistas que causam graves infecções (Shivae et al., 2021). Assim esses *scaffolds* se apresentam como grandes aliados no combate a infecções bacterianas de pele.

5 CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível produzir *scaffolds* de galactomanana oxidada e carboxietilquitosana em meio aquoso e sem a necessidade de reticulantes. A reação de processou pela formação de base de Schiff. Estes biomateriais foram preparados com diferentes composições (CEQA/CF10; CEQA/CF20; CEQA/CF50; CEQB/CF10; CEQB/CF20; CEQB/CF50). As análises mecânicas e reológicas demonstraram que independentemente da técnica utilizada, os *scaffolds* apresentaram o mesmo comportamento em relação aos módulos de armazenamento e compressão. O aumento do grau de oxidação da galactomanana e o menor grau de modificação da quitosana alteraram as interações, aumentando as propriedades elásticas dos géis. As análises de microscopia revelaram a estrutura altamente porosa e interligada, além de uma ampla distribuição de tamanho de poros, fatores esses relevantes para a migração de nutrientes e crescimento celular. O tamanho de poros é proporcional ao grau de oxidação, variando entre 20 e 400 μm . Estes valores estão dentro da faixa normalmente utilizada para aplicações na regeneração de tecido. Os suportes não apresentam toxicidade, mas o *scaffold* CEQA/CF20 e CEQB/CF20 se mostraram os mais biocompatíveis. Os ensaios de imersão em PBS permitiram avaliar o processo de degradação *in vitro*, os resultados mostraram que os *scaffolds* com o maior grau de oxidação se degradam mais lentamente em PBS e perde apenas 36% de sua massa em 28 dias, já os *scaffolds* com os menores graus de oxidação perde cerca de 65% no mesmo período. Estes hidrogéis são de particular interesse visto que podem ser obtidos a partir de biopolímeros biodegradáveis e biocompatíveis e apresentam propriedades tais como boa capacidade de intumescimento, alta porosidade, não citotóxicos e boa capacidade bactericida. Essas propriedades indicam que os *scaffolds* CEQA/CF20 e CEQB/CF20 apresentam-se como bons candidatos a utilização na restauração de tecidos.

REFERÊNCIAS

- ABTO, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS. Rbt 2023 - Dimensionamento Dos Transplantes No Brasil Em Cada Estado 2016-2023. **Https://Site.Abto.Org.Br/Conteudo/Rbt/**, [s. l.], v. 4, 2023. Disponível em: www.abto.org.br. Acesso em: 25 abr. 2024.
- AKHTAR, Aslam Abbasi; SANCES, Samuel; BARRETT, Robert; BREUNIG, Joshua J. Organoid and Organ-on-a-Chip Systems: New Paradigms for Modeling Neurological and Gastrointestinal Disease. **Current Stem Cell Reports**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 98–111, 2017.
- ALINEJAD, Yasaman; ADOUNGOTCHODO, Atma; GRANT, Michael P.; EPURE, Laura M.; ANTONIOU, John; MWALE, Fackson; LEROUGE, Sophie. Injectable Chitosan Hydrogels with Enhanced Mechanical Properties for Nucleus Pulposus Regeneration. **Tissue Engineering - Part A**, [s. l.], v. 25, n. 5–6, p. 303–313, 2019.
- ANDRADE, C. T.; AZERO, E. G.; LUCIANO, L.; GONÇALVES, M. P. Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: Comparison with locust bean gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 26, no. 2–3, p. 181–185, 1999.
- BALAKRISHNAN, Biji; JOSHI, Nitin; JAYAKRISHNAN, Athipettah; BANERJEE, Rinti. Self-crosslinked oxidized alginate/gelatin hydrogel as injectable, adhesive biomimetic scaffolds for cartilage regeneration. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 3650–3663, 2014.
- BALAKRISHNAN, Biji; SOMAN, Dawlee; PAYANAM, Umashanker; LAURENT, Alexandre; LABARRE, Denis; JAYAKRISHNAN, Athipettah. A novel injectable tissue adhesive based on oxidized dextran and chitosan. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 53, p. 343–354, 2017.
- BARNES, J. Matthew; PRZYBYLA, Laralynne; WEAVER, Valerie M. Tissue mechanics regulate brain development, homeostasis and disease. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 130, n. 1, p. 71–82, 2017.
- BENAMER, Wadiaa. Development of Preparative Methods for Chitosan Microparticles. **A thesis submitted to the University of Manchester**, [s. l.], p. 172, 2012. Disponível em: https://research.manchester.ac.uk/files/54528684/FULL_TEXT.PDF >. Acesso em: 20 mar. 2021.
- BHALODIA, Nayan R.; NARIYA, Pankaj B.; SHUKLA, V. J. Antibacterial and antifungal activity from flower extracts of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant. **International Journal of PharmTech Research**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 160–168, 2011.
- BOLTON, Sanford. **Pharmaceutical Statistics—Practical and Clinical Applications**. Fifth Edition (5th ed.). CRC Press. 2009

BRENNAN EP, REING J, CHEW D, MYERS-IRVIN JM, YOUNG EJ, Badylak SF. Antibacterial Activity within Degradation Products of Biological *Scaffolds* Composed of Extracellular Matrix. **Tissue Engineering**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 29491–2955, 2006.

BRIGIDA, De Santa; LÚCIA, Alba; ALMEIDA, Ferreira De. ANATOMIA E HISTOQUÍMICA DAS FOLHAS DE *Cassia fistula* L. (LEGUMINOSAE-CAESALPINIOIDEAE). **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, [s. l.], v. 11, p. 175–189, 2015.

BUCKERIDGE, Marcos S.; PANEGASSI, Valéria R.; ROCHA, Dalva C.; DIETRICH, Sonia M.C. Seed galactomannan in the classification and evolution of the leguminosae. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 871–875, 1995.

CAI, Kaiyong; ZHANG, Jun; DENG, Lin Hong; YANG, Li; HU, Yan; CHEN, Cong; XUE, Lei; WANG, Lu. Physical and biological properties of a novel hydrogel composite based on oxidized alginate, gelatin and tricalcium phosphate for bone tissue engineering. **Advanced Engineering Materials**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 1082–1088, 2007.

CAI, Zhao Sheng; SONG, Zhan Qian; YANG, Chun Sheng; SHANG, Shi Bin; YIN, Yan Bai. Synthesis, characterization and antibacterial activity of quaternized N,O-(2-carboxyethyl) chitosan. **Polymer Bulletin**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 445–456, 2009.

CAO, Zhen; BAI, Xiao; WANG, Chongbin; REN, Liling; MA, Dongyang. A simple polysaccharide based injectable hydrogel compositing nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering. **Materials Letters**, [s. l.], v. 293, 2021.

CARLOS, Carlos Rhamon; EVERTON, Everton Lucas; ARAUJO, Luis Felipe S.; LEONIRA, Leonira Morais; FEITOSA, Judith Pessoa A.; CUNHA, Ana Filipa; OLIVEIRA, Mariana B.; MANO, João F.; DA S. MACIEL, Jeanny. Synthesis and characterization of *scaffolds* produced under mild conditions based on oxidized cashew gums and carboxyethyl chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 176, p. 26–36, 2021.

CHANG, Bei; AHUJA, Neelam; MA, Chi; LIU, Xiaohua. Injectable *scaffolds*: Preparation and application in dental and craniofacial regeneration. **Materials Science and Engineering R: Reports**, [s. l.], v. 111, p. 1–26, 2017.

CHEN, Guoping; KAWAZOE, Naoki. **by Ice Particulate Method for Tissue Engineering**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016.

CHEN, Jing; LI, Shuya; ZHANG, Ye; WANG, Wei; ZHANG, Xiang; ZHAO, Yangyang; WANG, Yucai; BI, Hong. A Reloadable Self-Healing Hydrogel Enabling Diffusive Transport of C-Dots Across Gel–Gel Interface for Scavenging Reactive Oxygen Species. **Advanced Healthcare Materials**, [s. l.], v. 6, n. 21, p. 1–10, 2017.

CHRESTANI, Francielli; SIERAKOWSKI, Maria Rita; DE ANDRADE UCHOA, Daniel Esdras; NOZAWA, Carlos; SASSAKI, Guilherme Lanzi; GORIN, Philip Albert James; ONO, Lucy. *In vitro* antiherpetic and antirotaviral activities of a sulfate prepared from *Mimosa scabrella* galactomannan. **International Journal of Biological**

Macromolecules, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 453–457, 2009.

COSTA, Cristiane N.; TEIXEIRA, Viviane G.; DELPECH, Marcia C.; SOUZA, Josefa Virginia S.; COSTA, Marcos A.S. Viscometric study of chitosan solutions in acetic acid/sodium acetate and acetic acid/sodium chloride. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 133, p. 245–250, 2015.

CUNHA, Pablyana L.R.; VIEIRA, Ícaro G.P.; ARRIAGA, Ângela M.C.; DE PAULA, R. C.M.; FEITOSA, Judith P.A. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 880–885, 2009.

CURTI, Filis; DRAGUŞIN, Diana Maria; SERAFIM, Andrada; IOVU, Horia; STANCU, Izabela Cristina. Development of thick paste-like inks based on superconcentrated gelatin/alginate for 3D printing of *scaffolds* with shape fidelity and stability. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 122, 2021.

DE ARAUJO, Alyne Rodrigues; QUELEMES, Patrick Veras; PERFEITO, Márcia Luana Gomes; DE LIMA, Luíza Ianny; SÁ, Melka Coêlho; NUNES, Paulo Humberto Moreira; JOANITTI, Graziella Anselmo; EATON, Peter; SOARES, Maria José dos Santos; DE SOUZA DE ALMEIDA LEITE, José Roberto. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–10, 2015.

DE OLIVEIRA, Ariel C.; SABINO, Roberta M.; SOUZA, Paulo R.; MUNIZ, Edvani C.; POPAT, Ketul C.; KIPPER, Matt J.; ZOLA, Rafael S.; MARTINS, Alessandro F. Chitosan/gellan gum ratio content into blends modulates the *scaffolding* capacity of hydrogels on bone mesenchymal stem cells. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 106, 2020.

DE SOUSA, Felipe Domingos; VASCONSELOS, Pedrinha Diógenes; DA SILVA, Ayrles Fernanda Brandão; MOTA, Erika Freitas; DA ROCHA TOMÉ, Adriana; MENDES, Francisco Rogênio da Silva; GOMES, Anida Maria Moraes; ABRAHAM, David J.; SHIWEN, Xu; OWEN, James S.; LOURENZONI, Marcos Roberto; CAMPOS, Adriana Rolim; MOREIRA, Renato de Azevedo; MONTEIRO-MOREIRA, Ana Cristina de Oliveira. Hydrogel and membrane *scaffold* formulations of Frutalin (breadfruit lectin) within a polysaccharide galactomannan matrix have potential for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 121, p. 429–442, 2019.

DEA, Iain C.M.; MORRISON, Anthony. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, [s. l.], vol. 31, no. C, p. 241–312, 1975. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60298-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60298-X). DENIZOT, François; LANG, Rita. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 271–277, 1986.

DING, Fuyuan; SHI, Xiaowen; LI, Xiaoxia; CAI, Jie; DUAN, Bo; DU, Yumin. Homogeneous synthesis and characterization of quaternized chitin in NaOH/urea

aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 422–426, 2012.

DURUEL TUĞBA, ANIL SERAÇ, AKMAKB, ABDULLAH AKMANA, RAHIME M. NOHUTCUA, Menems, e Gümüş, dereliöğlub. Sequential IGF-1 and BMP-6 releasing chitosan / alginate / PLGA hybrid *scaffolds* for periodontal regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 104, p. 232–241, 2017.

FIGUEIRÓ, S. D.; GÓES, Júlio C.; MOREIRA, R. A.; SOMBRA, A. S.B. On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan-collagen films. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 313–320, 2004.

GAUTAM, Sneha; SHARMA, Chhavi; PUROHIT, Shiv Dutt; SINGH, Hemant; DINDA, Amit Kumar; POTDAR, Pravin D.; CHOU, Chia Fu; MISHRA, Narayan Chandra. Gelatin-polycaprolactone-nanohydroxyapatite electrospun nanocomposite *scaffold* for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 119, 2021.

GEMIN, E.; FERREIRA, C. E.O.; SIERAKOWSKI, M. R.; JORGE, T. R.; JOINEAU, M. E.G.; ONO, Lucy. *In vitro* anti-HSV-1 activity of a chemically sulfated galactomannan from *Leucaena leucocephala* seeds. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 165–170, 2010.

GHANBARI, Mojgan; SALAVATI-NIASARI, Masoud; MOHANDÉS, Fatemeh; FIROUZI, Zohreh; MOUSAVI, Seyed Danial. The impact of zirconium oxide nanoparticles content on alginate dialdehyde-gelatin *scaffolds* in cartilage tissue engineering. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 335, 2021.

GHITMAN, Jana; BIRU, Elena Iuliana; COJOCARU, Elena; PIRCALABIORU, Gratiela Gradisteanu; VASILE, Eugeniu; IOVU, Horia. Design of new bioinspired GO-COOH decorated alginate/gelatin hybrid *scaffolds* with nanofibrous architecture: structural, mechanical and biological investigations. **RSC Advances**, [s. l.], v. 11, n. 22, p. 13653–13665, 2021.

GIOVAGNOLI, Stefano; TSAI, Tsuimin; DELUCA, Patrick P. Formulation and release behavior of doxycycline-alginate hydrogel microparticles embedded into pluronic F127 thermogels as a potential new vehicle for doxycycline intradermal sustained delivery. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 212–220, 2010.

GOMEZ, C G; RINAUDO, M.; VILLAR, M. A. Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 296–304, 2007.

GU, Haigang; YUE, Zhilian; LEONG, Wen Shing; NUGRAHA, Bramasta; TAN, Lay Poh. Control of *in vitro* neural differentiation of mesenchymal stem cells in 3D macroporous, cellulosic hydrogels. **Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 245–253, 2010.

GUZELGULGEN, Meltem; OZKENDIR-INANC, Dilce; YILDIZ, Umit Hakan; ARSLAN-

YILDIZ, Ahu. Glucuronoxylan-based quince seed hydrogel: A promising *scaffold* for tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 180, p. 729–738, 2021.

HOZUMI, Takuro; KAGEYAMA, Tatsuto; OHTA, Seiichi; FUKUDA, Junji; ITO, Taichi. Injectable Hydrogel with Slow Degradability Composed of Gelatin and Hyaluronic Acid Cross-Linked by Schiff's Base Formation. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 288–297, 2018.

HUANG, Jun; XIE, Haihua; HU, Sheng; XIE, Tian; GONG, Jinyan; JIANG, Chengjun; GE, Qing; WU, Yuanfeng; LIU, Shiwang; CUI, Yanli; MAO, Jianwei; MEI, Lehe. Preparation, characterization, and biochemical activities of N-(2-Carboxyethyl)chitosan from squid pens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 63, no. 9, p. 2464–2471, 2015.

HUANG, Jun; XIE, Haihua; YE, Hui; XIE, Tian; LIN, Yuecheng; GONG, Jinyan; JIANG, Chengjun; WU, Yuanfeng; LIU, Shiwang; CUI, Yanli; MAO, Jianwei; MEI, Lehe. Effect of carboxyethylation degree on the adsorption capacity of Cu(II) by N-(2-carboxyethyl)chitosan from squid pens. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 138, p. 301–308, 2016.

IBRAHIM, H. M.; MOSTAFA, M.; KANDILE, N. G. Potential use of N-carboxyethylchitosan in biomedical applications: Preparation, characterization, biological properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 149, p. 664–671, 2020.

ISKANDAR, Lilis; ROJO, Luis; DI SILVIO, Lucy; DEB, Sanjukta. The effect of chelation of sodium alginate with osteogenic ions, calcium, zinc, and strontium. **Journal of Biomaterials Applications**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 573–584, 2019.

JAMIR, Kizukala; BADITHI, Nanibabu; VENUMADHAV, Kusuma; SESHAGIRIRAO, Kottapalli. Characterization and comparative studies of galactomannans from *Bauhinia vahlii*, *Delonix elata*, and *Peltophorum pterocarpum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 134, p. 498–506, 2019.

JOSHI, Prutha; AHMED, Md Shakir Uddin; VIG, Komal; VEGA ERRAMUSPE, Iris Beatriz; AUAD, Maria L. Synthesis and characterization of chemically crosslinked gelatin and chitosan to produce hydrogels for biomedical applications. **Polymers for Advanced Technologies**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 2229–2239, 2021.

KARAGEORGIU, Vassilis; KAPLAN, David. Porosity of 3D biomaterial *scaffolds* and osteogenesis. **Biomaterials**, [s. l.], v. 26, n. 27, p. 5474–5491, 2005.

KASAAI, Mohammad R. Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 477–488, 2007.

KENNEDY, Kelsey M.; BHAW-LUXIMON, Archana; JHURRY, Dhanjay. Skin Tissue Engineering: Biological Performance of Electrospun Polymer *Scaffolds* and

Translational Challenges. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 201–214, 2017.

KESHK, Sherif M.A.S.; RAMADAN, Ahmed M.; AL-SEHEMI, Abdullah G.; IRFAN, Ahmad; BONDOCK, Samir. An unexpected reactivity during periodate oxidation of chitosan and the affinity of its 2, 3-di-aldehyde toward sulfa drugs. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 175, p. 565–574, 2017.

KHOR, Eugene; LIM, Lee Yong. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, [s. l.], v. 24, n. 13, p. 2339–2349, 2003.

KIM, Tae Rim; KIM, Min Su; GOH, Tae Sik; LEE, Jung Sub; KIM, Yun Hak; YOON, Seog Young; LEE, Chi Seung. Evaluation of structural and mechanical properties of porous artificial bone *scaffolds* fabricated via advanced TBA-based freeze-gel casting technique. **Applied Sciences (Switzerland)**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 1–17, 2019.

KOLATHUPALAYAM, Balu; RANGARAJ, Suriyaprabha; SUBRAMANI, Karthik. Biomimetic TiO₂-chitosan / sodium alginate blended nanocomposite *scaffolds* for tissue engineering applications. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 110, 2020.

KUBOTA, Naoji; EGUCHI, Yukari. Facile preparation of water-soluble N-acetylated chitosan and molecular weight dependence of its water-solubility. **Polymer Journal**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 123–127, 1997.

KUETE, Victor; KARAOSMANOĞLU, Oğuzhan; SIVAS, Hülya. Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. **Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases**, [s. l.], p. 271–297, 2017.

LAVUDI, Harikrishna Naik; KOTTAPALLI, Seshagirirao; GOYCOOLEA, Francisco M. Extraction and physicochemical characterization of galactomannans from *Dichrostachys cinerea* seeds. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 82, p. 451–456, 2018.

LEITE, Álvaro J; COSTA, Rui R; COSTA, Ana M S; MACIEL, Jeanny S; COSTA, José F G; PAULA, Regina C M De; MANO, João F. The potential of cashew gum functionalization as building blocks for layer-by-layer films. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 174, p. 849–857, 2017.

LI, Dandan; YANG, Na; ZHANG, Yao; GUO, Lunan; SANG, Shangyuan; JIN, Zhengyu; XU, Xueming. Structural and physicochemical changes in guar gum by alcohol–acid treatment. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 179, p. 2–9, 2018.

LI, Yongsan; ZHANG, Yingwei; SHI, Feng; TAO, Lei; WEI, Yen; WANG, Xing. Modulus-regulated 3D-cell proliferation in an injectable self-healing hydrogel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 149, p. 168–173, 2017.

LI, Yuanhong; CHI, Ya-qi; YU, Chen-hao; XIE, Yu; XIA, Meng-ying; ZHANG, Chao-liang; HAN, Xianglong; PENG, Qiang. Drug-free and non-crosslinked chitosan *scaffolds* with efficient antibacterial activity against both Gram-negative and Gram-

positive bacteria. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 241, p. 116386, 2020.

LIU, Jia; WANG, Ke; LUAN, Jie; WEN, Zhi; WANG, Lei; LIU, Zhilan; WU, Guangyao; ZHUO, Renxi. Visualization of in situ hydrogels by MRI in vivo. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. 1343–1353, 2016.

LIU, Juan; ZHENG, Huaiyuan; POH, Patrina S.P.; MACHENS, Hans Günther; SCHILLING, Arndt F. Hydrogels for engineering of perfusable vascular networks. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 15997–16016, 2015.

LIU, Shunli; KANG, Mengmeng; LI, Kewen; YAO, Fang; ODERINDE, Olayinka; FU, Guodong; XU, Liqun. Polysaccharide-templated preparation of mechanically-tough, conductive and self-healing hydrogels. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 334, 2017, p. 2222–2230, 2018.

LUCAS DE LIMA, Everton; FITTIPALDI VASCONCELOS, Niédja; DA SILVA MACIEL, Jeanny; KARINE ANDRADE, Fábila; SILVEIRA VIEIRA, Rodrigo; ANDRADE FEITOSA, Judith Pessoa. Injectable hydrogel based on dialdehyde galactomannan and N-succinyl chitosan: a suitable platform for cell culture. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 31, n. 1, 2020.

MA, Peter X. *Scaffolds* for tissue fabrication. **5th World Congress: Enabling Technologies and New Markets, Nanocomposites 2005**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 30–40, 2004.

MACIEL, Jeanny S; AZEVEDO, Sara; CORREIA, Clara R; COSTA, Ana M S; COSTA, Rui R; MAGALHÃES, Francisco A; ABREU, Aliny; MONTEIRO, De Sousa; FRANCISCO, José; COSTA, Gomes; PAULA, Regina C M De; FEITOSA, Judith P A; MANO, João F. Oxidized Cashew Gum *Scaffolds* for Tissue Engineering. **Macromolecular materials and engineering**, [s. l.], v. 304, n. 3, p. 1–11, 2019.

MAIA, João; FERREIRA, Lino; CARVALHO, Rui; RAMOS, Manuel A.; GIL, Maria H. Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels. **Polymer**, [s. l.], v. 46, n. 23, p. 9604–9614, 2005.

MIKKONEN, Kirsi S.; RITA, Hannu; HELÉN, Harry; TALJA, Riku A.; HYVÖNEN, Lea; TENKANEN, Maija. Effect of polysaccharide structure on mechanical and thermal properties of galactomannan-based films. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 3198–3205, 2007.

MOURA NETO, E.; SOMBRA, V. G.; RICHTER, A. R.; ABREU, C. M.W.S.; MACIEL, J. S.; CUNHA, P. L.R.; ONO, L.; SIERAKOWSKI, M. R.; FEITOSA, J. P.A.; DE PAULA, R. C.M. Chemically sulfated galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* seed: Characterization and toxicity evaluation. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 1013–1017, 2014.

MUHAMMAD, Muhammad; WILLEMS, Christian; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, Julio; GALLEGUO-FERRER, Gloria; GROTH, Thomas. Synthesis and characterization of oxidized polysaccharides for in situ forming hydrogels. **Biomolecules**, [s. l.], v. 10, n.

8, p. 1–18, 2020.

NAAHIDI, Sheva; JAFARI, Mousa; LOGAN, Megan; WANG, Yujie; YUAN, Yongfang; BAE, Hojae; DIXON, Brian; CHEN, P. Biocompatibility of hydrogel-based *scaffolds* for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 35, n. 5, 2016, p. 530–544, 2017.

OLIVEIRA, Luciana Soares de Andrade Freitas; OLIVEIRA, Conceição Silva; MACHADO, Ana Paula Lobo; ROSA, Fabiana Paim. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 37, 2010.

OLIVEIRA, Marcelo F.; MAIA, Izaque A.; NORITOMI, Pedro Y.; NARGI, Giampiero C.; SILVA, Jorge V.L.; FERREIRA, Betina M. P.; DUEK, Eliana A. R. Construção de *Scaffolds* para engenharia tecidual utilizando prototipagem rápida. **Matéria (Rio de Janeiro)**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 373–382, 2007.

ORYAN, Ahmad; SAHVIEH, Sonia. Effectiveness of chitosan *scaffold* in skin, bone and cartilage healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 104, p. 1003–1011, 2017.

PAL, Dan Bahadur; TIWARI, Amit Kumar; SRIVASTAVA, Neha; HASHEM, Abeer; ABD ALLAH, Elsayed Fathi. Thermal studies of biomass obtained from the seeds of *Syzygium cumini* and *Cassia fistula* L. and peel of *Cassia fistula* L. fruit. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [s. l.], v. 13, 2021.

PARK, Ki Ho; CHONG, Youhoon. Strain - specific anti - biofilm and antibiotic - potentiating activity of 3', 4' - difluoroquercetin. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.

PELLÁ, Michelly C G; LIMA-TENÓRIO, Michele K; TENÓRIO-NETO, Ernandes T. Chitosan-based hydrogels : From preparation to biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 196, p. 233–245, 2018.

PINTO, Rosana V.; GOMES, Pedro S.; FERNANDES, Maria H.; COSTA, Maria E.V.; ALMEIDA, Maria M. Glutaraldehyde-crosslinking chitosan *scaffolds* reinforced with calcium phosphate spray-dried granules for bone tissue applications. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 109, 2019, 2020.

PRIVAR, Yuliya; SHASHURA, Dariya; PESTOV, Alexander; ZIATDINOV, Albert; AZAROVA, Yuliya; BRATSKAYA, Svetlana. Effect of regioselectivity of chitosan carboxyalkylation and type of cross-linking on the metal-chelate sorption properties toward ciprofloxacin. **Reactive and Functional Polymers**, [s. l.], v. 150, 2020.

QI, Xiaoliang; ZHANG, Mengying; SU, Ting; PAN, Wenhao; TONG, Xianqin; ZENG, Qiankun; XIONG, Wei; JIANG, Ning; QIAN, Yuna; LI, Zhipeng; HE, Xiaojun; SHEN, Liangliang; ZHOU, Zaigang; SHEN, Jianliang. Biocompatible Hydrogels Based on Food Gums with Tunable Physicochemical Properties as *Scaffolds* for Cell Culture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 68, n. 12, p. 3770–3778, 2020.

QU, Jin; ZHAO, Xin; MA, Peter X.; GUO, Baolin. pH-responsive self-healing injectable hydrogel based on N-carboxyethyl chitosan for hepatocellular carcinoma therapy. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 58, p. 168–180, 2017.

RACINE, Lisa; TEXIER, Isabelle; AUZÉLY-VELTY, Rachel. Chitosan-based hydrogels: recent design concepts to tailor properties and functions. **Polymer International**, [s. l.], v. 66, n. 7, p. 981–998, 2017.

RAMLII, Roslinda Hani; FHONG SOON, Chin; MOHD RUS, Anika Zafiah. Synthesis of Chitosan/Alginate/Silver Nanoparticles Hydrogel Scaffold. **MATEC Web of Conferences**, [s. l.], v. 78, p. 01031, 2016.

RASOULIANBOROUJENI, Morteza; KIAIE, Nasim; TABATABAEI, Fahimeh Sadat; YADEGARI, Amir; FAHIMIPOUR, Farahnaz; KHOSHROO, Kimia; TAYEBI, Lobat. Dual Porosity Protein-based Scaffolds with Enhanced Cell Infiltration and Proliferation. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

REKULAPALLY, Rohit; UDAYACHANDRIKA, K.; HAMLIPUR, Sirisha; SASIDHARAN NAIR, Anuja; PAL, Biswajit; SINGH, Shashi. Tissue engineering of collagen scaffolds crosslinked with plant based polysaccharides. **Progress in Biomaterials**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 29–41, 2021.

REN, Bowen; CHEN, Xueyun; DU, Shoukang; MA, Ye; CHEN, Huinan; YUAN, Guoliang; LI, Jianliang; XIONG, Dangsheng; TAN, Huaping; LING, Zhonghua; CHEN, Yong; HU, Xiaohong; NIU, Xiaohong. Injectable polysaccharide hydrogel embedded with hydroxyapatite and calcium carbonate for drug delivery and bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 118, p. 1257–1266, 2018.

RESMI, Rajalekshmi; PARVATHY, Jayasree; JOHN, Annie; JOSEPH, Roy. Injectable self-crosslinking hydrogels for meniscal repair: A study with oxidized alginate and gelatin. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 234, January, 2020.

REYS, Lara Lopes; SILVA, Simone Santos; PIRRACO, Rogério Pedro; MARQUES, Alexandra Pinto; MANO, João Filipe; SILVA, Tiago Henriques; REIS, Rui Luís. Influence of freezing temperature and deacetylation degree on the performance of freeze-dried chitosan scaffolds towards cartilage tissue engineering. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 95, p. 232–240, 2017.

RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, [s. l.], v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

ROBINSON, G.; ROSS-MURPHY, S. B.; MORRIS, E. R. Viscosity-molecular weight relationships, intrinsic chain flexibility, and dynamic solution properties of guar galactomannan. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 107, n. 1, p. 17–32, set. 1982.

RODRIGUES, Murilo Á. Vigilato; MARANGON, Crisiane A.; MARTINS, Virginia da C. Amaro; PLEPIS, Ana Maria de Guzzi. Chitosan/gelatin films with jatobá resin: Control of properties by vegetal resin inclusion and degree of acetylation

modification. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 182, p. 1737–1745, 2021.

RODRIGUEZ-CANTO, W.; CHEL-GUERRERO, L.; FERNANDEZ, V. V.A.; AGUILAR-VEGA, M. Delonix regia galactomannan hydrolysates: Rheological behavior and physicochemical characterization. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 206, 2018, p. 573–582, 2019.

SADEGHI, Ali; MOZTARZADEH, Fathollah; AGHAZADEH MOHANDESI, Jamshid. Investigating the effect of chitosan on hydrophilicity and bioactivity of conductive electrospun composite *scaffold* for neural tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 121, p. 625–632, 2019.

SAKAKIBARA, Caroline Novak; SIERAKOWSKI, Maria Rita; LUCYSZYN, Neoli; DE FREITAS, Rilton Alves. TEMPO-mediated oxidation on galactomannan: Gal/Man ratio and chain flexibility dependence. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 153, p. 371–378, 2016.

SANGKERT, Supaporn; KAMOLMATYAKUL, Suttatip; GELINSKY, Michael; MEESANE, Jirut. 3D printed *scaffolds* of alginate/polyvinylalcohol with silk fibroin based on mimicked extracellular matrix for bone tissue engineering in maxillofacial surgery. **Materials Today Communications**, [s. l.], v. 26, 2021.

SARAZIN, Pierre; ROY, Xavier; FAVIS, Basil D. Controlled preparation and properties of porous poly(L-lactide) obtained from a co-continuous blend of two biodegradable polymers. **Biomaterials**, [s. l.], v. 25, n. 28, p. 5965–5978, 2004.

SASHIWA, Hitoshi; YAMAMORI, Naoki; ICHINOSE, Yoshifumi; SUNAMOTO, Junzo; AIBA, Sei ichi. Chemical modification of chitosan, 17: Michael reaction of chitosan with acrylic acid in water. **Macromolecular Bioscience**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 231–233, 2003a.

SASHIWA, Hitoshi; YAMAMORI, Naoki; ICHINOSE, Yoshifumi; SUNAMOTO, Junzo; AIBA, Sei Ichi. Michael reaction of chitosan with various acryl reagents in water. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. 1250–1254, 2003b.

SHARMA, Swati; MADHYASTHA, Harishkumar; LAXMI SWETHA, K.; MARAVAJJALA, Kavya Sree; SINGH, Archana; MADHYASTHA, Radha; NAKAJIMA, Yuichi; ROY, Aniruddha. Development of an in-situ forming, self-healing *scaffold* for dermal wound healing: in-vitro and in-vivo studies. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 128, p. 112263, 2021.

SHIVAE, Ali; MESKINI, Maryam; ROODAKI, Rojin Rahimi Nejad; KALANI, Behroz Sadeghi; MIRSHAKAR, Maryam; RAZAVI, Shabnam. Evaluation of the effects of nano-curcumin on the expression of genes involved in biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. **Gene Reports**, [s. l.], v. 23, 2020, p. 101026, 2021.

SIERAKOWSKI, M. R.; MILAS, M.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. Specific modifications of galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 51–57, 2000.

SIGNINI, Roberta; CAMPANA FILHO, Sérgio P. Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. **Polímeros**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 58–64, 2001.

SILLER, Martin; AMER, Hassan; BACHER, Markus; ROGGENSTEIN, Walter; ROSENAU, Thomas; POTTHAST, Antje. Effects of periodate oxidation on cellulose polymorphs. **Cellulose**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 2245–2261, 2015.

SINNO, Hani; PRAKASH, Satya. Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. **Plastic Surgery International**, [s. l.], v. 2013, p. 1–7, 2013.

SIQUEIRA, Nataly M.; PAIVA, Bruno; CAMASSOLA, Melissa; ROSENTHAL-KIM, Emily Q.; GARCIA, Ketlin C.; DOS SANTOS, Francisco P.; SOARES, Rosane M.D. Gelatin and galactomannan-based *scaffolds*: Characterization and potential for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 133, p. 8–18, 2015.

SIRVIÖ, Juho Antti; LIIMATAINEN, Henrikki; VISANKO, Miikka; NIINIMÄKI, Jouko. Optimization of dicarboxylic acid cellulose synthesis: Reaction stoichiometry and role of hypochlorite scavengers. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 114, p. 73–77, 2014.

SIVASHANKARI, P. R.; PRABAHARAN, M. Three-dimensional porous *scaffolds* based on agarose/chitosan/graphene oxide composite for tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 146, p. 222–231, 2020.

SKORIK, Yury A.; GOMES, Carlos A.R.; VASCONCELOS, M. Teresa S.D.; YATLUK, Yury G. N-(2-Carboxyethyl)chitosans: Regioselective synthesis, characterisation and protolytic equilibria. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 338, n. 3, p. 271–276, 2003.

SOLOVIEVA, Elena V.; FEDOTOV, Alexander Yu; MAMONOV, Vasily E.; KOMLEV, Vladimir S.; PANTELEYEV, Andrey A. Fibrinogen-modified sodium alginate as a *scaffold* material for skin tissue engineering. **Biomedical Materials (Bristol)**, [s. l.], l. 13, n. 2, 2018.

SOUZA, Paulo R.; DE OLIVEIRA, Ariel C.; VILSINSKI, Bruno H.; KIPPER, Matt J.; MARTINS, Alessandro F. Polysaccharide-based materials created by physical processes: From preparation to biomedical applications. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 13, n. 5, 2021.

SPICER, Christopher D. Hydrogel *scaffolds* for tissue engineering: The importance of polymer choice. **Polymer Chemistry**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 184–219, 2020.

STEFFENS, Daniela; BRAGHIROLI, Daikelly I.; MAURMANN, Natasha; PRANKE, Patricia. Update on the main use of biomaterials and techniques associated with tissue engineering. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 1474–1488, 2018.

SUMATHI, S.; RAY, Alok R. Release behaviour of drugs from tamarind seed polysaccharide tablets. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 12–18, 2002.

TANG, Fengling; LV, Lingmei; LU, Fei; RONG, Bao; LI, Zhiquan; LU, Bitao; YU, Kun; LIU, Jiawei; DAI, Fangying; WU, Dayang; LAN, Guangqian. Preparation and characterization of N-chitosan as a wound healing accelerator. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 93, p. 1295–1303, 2016.

TONIUTTO, Pierluigi; ZANETTO, Alberto; FERRARESE, Alberto; BURRA, Patrizia. Current challenges and future directions for liver transplantation. **Liver International**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 317–327, 2017.

WAIBEL, Kirk H.; HANEY, Brian; MOORE, Merrideth; WHISMAN, Bonnie; GOMEZ, Robert. Safety of chitosan bandages in shellfish allergic patients. **Military Medicine**, [s. l.], v. 176, n. 10, p. 1153–1156, 2011.

WANG, Jianhua; WANG, Yingying; SUN, Xiaomin; LIU, Deshuai; HUANG, Chenguang; WU, Jiulin; YANG, Chunrong; ZHANG, Qiqing. Biomimetic cartilage scaffold with orientated porous structure of two factors for cartilage repair of knee osteoarthritis. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 1710–1721, 2019.

WENG, Lihui; CHEN, Xuming; CHEN, Weiliam. Rheological characterization of in situ crosslinkable hydrogels formulated from oxidized dextran and N-carboxyethyl chitosan. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1109–1115, 2007.

XIAO, Congming; YOU, Rongrui; FAN, Ying; ZHANG, Yue. International Journal of Biological Macromolecules Tunable functional hydrogels formed from a versatile water-soluble chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 85, p. 386–390, 2016.

XU, Huan; ZHANG, Lina; CAI, Jie. Injectable, Self-Healing, β -Chitin-Based Hydrogels with Excellent Cytocompatibility, Antibacterial Activity, and Potential As Drug/Cell Carriers. **ACS Applied Bio Materials**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 196–204, 2019.

YANG, Shuoshuo; DONG, Qi; YANG, Hongjun; LIU, Xin; GU, Shaojin; ZHOU, Yingshan; XU, Weilin. N-carboxyethyl chitosan fibers prepared as potential use in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 82, p. 1018–1022, 2016.

YU, Danmi; XIAO, Suyao; TONG, Chunyi; CHEN, Lin; LIU, Xuanming. Dialdehyde starch nanoparticles: Preparation and application in drug carrier. **Chinese Science Bulletin**, [s. l.], v. 52, n. 21, p. 2913–2918, 2007.

YU, Feng; CAO, Xiaodong; LI, Yuli; ZENG, Lei; YUAN, Bo; CHEN, Xiaofeng. An injectable hyaluronic acid/PEG hydrogel for cartilage tissue engineering formed by integrating enzymatic crosslinking and Diels-Alder “click chemistry.” **Polymer Chemistry**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 1082–1090, 2014.

ZHANG, Chang; YANG, Xiaoshuang; HU, Wanqing; HAN, Xianshun; FAN, Lihong; TAO, Shengxiang. Preparation and characterization of carboxymethyl chitosan/collagen peptide/oxidized konjac composite hydrogel. **International Journal**

of **Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 149, p. 31–40, 2020.

ZHANG, Jun; ALLARDYCE, Benjamin J.; RAJKHOWA, Rangam; ZHAO, Yan; DILLEY, Rodney J.; REDMOND, Sharon L.; WANG, Xungai; LIU, Xin. 3D Printing of Silk Particle-Reinforced Chitosan Hydrogel Structures and Their Properties. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 3036–3046, 2018.

ZHANG, Liru; LIU, Jie; ZHENG, Xuejing; ZHANG, Ali; ZHANG, Xianliang; TANG, Keyong. Pullulan dialdehyde crosslinked gelatin hydrogels with high strength for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 216, p. 45–53, 2019.

ZHAO, H., HEINDEL, N. D. Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 400–402, 1991.

ZHU, Mingjin; GE, Liming; LYU, Yongbo; ZI, Yaxin; LI, Xinying; LI, Defu; MU, Changdao. Preparation, characterization and antibacterial activity of oxidized κ -carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 174, p. 1051–1058, 2017.