



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARLOS RHAMON DO NASCIMENTO FERREIRA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SUPORTES POROSOS (*SCAFFOLDS*) À
BASE DE GOMA DO CAJUEIRO OXIDADA E CARBOXIETIL QUITOSANA**

FORTALEZA

2019

CARLOS RHAMON DO NASCIMENTO FERREIRA

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SUPORTES POROSOS (*SCAFFOLDS*) À
BASE DE GOMA DO CAJUEIRO OXIDADA E CARBOXIETIL QUITOSANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

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

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

F44s Ferreira, Carlos Rhamon do Nascimento.

Síntese e caracterização de suportes porosos (scaffolds) à base de goma do cajueiro oxidada e carboxietil quitosana / Carlos Rhamon do Nascimento Ferreira. – 2019.
76 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Jeanny da Silva Maciel.

1. Hidrogéis. 2. Engenharia de tecidos. 3. Suportes porosos. 4. *Anacardium occidentale*.
5. Quitosana. I. Título.

CDD 540

CARLOS RHAMON DO NASCIMENTO FERREIRA

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SUPORTES POROSOS (SCAFFOLDS) A
BASE DE GOMA DO CAJUEIRO OXIDADA E CARBOXIETIL QUITOSANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Jeanny da Silva Maciel (Orientadora)
Universidade Federal do Ceara (UFC)

Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa
Universidade Federal do Ceara (UFC)

Prof. Dr. Guilherme Augusto Magalhães Júnior
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

Eu dedico esse trabalho a minha avó (Dona Maria) e toda minha família pelo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

A minha vó Dona Maria e minha família, pelo carinho, amor e por todas as ajudas nessa longa estrada, que mesmo com essa distância estiveram tão presentes.

Tárcia Priscila obrigado por ser a pessoa mais paciente que conheço, mesmo com toda essa correria esteve aqui do meu lado, obrigado por ser essa amiga, obrigado por todos os conselhos, pois sei que sem eles nada disso teria acontecido.

Ao meu grande amigo e irmão Irisvan Ribeiro pelos conselhos e ajuda em todos os momentos.

A minha orientadora Prof^ª. Dra. Jeanny da Silva Maciel pela oportunidade e por seus conselhos que foram fundamentais para o resultado desse trabalho.

Às professoras do Laboratório de Polímeros Judith Feitosa, Regina Célia e Pablyana da Cunha por todo o suporte e disponibilidade.

A Everton Lucas por toda sua paciência e incentivo para a realização desse trabalho.

Ao aluno de iniciação científica Luís Felipe pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

A todo o grupo de pesquisa do Laboratório de Polímeros (LabPol) por ter me recebido de braços abertos, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração e por todo o apoio nos momentos de felicidade e de tristeza. Vocês são minha segunda família! Muito obrigado.

À Nádia pelas análises de FTIR.

À Natália Pires pelas análises de reologia e por seus ensinamentos.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da UFC.

A todo o corpo docente da Química pela dedicação e esforço para ensinar os alunos.

Aos órgãos CNPq, CAPES, FUNCAP e INOMAT pelo auxílio financeiro ao projeto.

Enfim, quero agradecer a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho, deixo aqui meu muito obrigado.

“A humildade exprime uma das raras certezas que estou certo: a de que ninguém é superior a ninguém.”

(Paulo Freire)

RESUMO

A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que visa desenvolver substituintes que restauram, mantêm, ou aumentam a função de um tecido deteriorado. A goma do cajueiro é composta de uma cadeia principal de galactose ligada por C-1 e C-3, com ramificações de galactose ligada por C-1 e C-6. Este padrão de ligação torna essa goma susceptível a oxidação pelo íon periodato, originando um derivado com duas unidades de aldeído por unidade monossacarídica, podendo agir como agente reticulante frente a quitosana através da formação de base de *Schiff* (C=N). Este trabalho propõe a síntese de suporte porosos (*scaffolds*) a partir da goma do cajueiro oxidada e carboxietil quitosana (CEQ) via reação de base de *Schiff* formando géis de ligações cruzadas entre os dois polímeros. Os derivados oxidados foram caracterizados por FTIR e GPC. A modificação foi confirmada pelo aparecimento da banda em 1735 cm^{-1} , que foi atribuída à ligação C=O no FTIR. A introdução do grupo carboxietil na CEQ também foi confirmada pelo aparecimento da banda em 1771 cm^{-1} , atribuída a ligação C-O de carboxilato. Os hidrogéis foram preparados pela mistura da GCOx com CEQ (ambos na concentração de 2%) e na razão de 1:1 (v/v). A partir do tempo de gelificação foi observado que os hidrogéis apresentam valores de T_{gel} inferiores a 5 min. As análises reológicas evidenciaram que a quantidade dos grupos aldeídicos da GCOx desempenha papel importante no processo de reticulação. A reação entre GCOx-CEQ é favorecida com o incremento da temperatura (20°C a 60°C) no processo de reticulação. O MEV mostrou que os hidrogéis são formados por estruturas porosas com poros de diâmetros médios entre 63 ± 6 à $244\pm 24\text{ }\mu\text{m}$, e com uma porosidade de $26,8\pm 0,6$ à $69,2\pm 0,3\%$. Os estudos de degradação em PBS mostraram que os *scaffolds* apresentam uma perda de massa lenta durante o período de 28 dias. Os ensaios mecânicos revelaram um comportamento predominantemente elástico dos hidrogéis. Assim é possível verificar que os hidrogéis apresentam potencial para aplicação como suportes porosos na regeneração de tecidos, visto que mostram boa moldabilidade de suas propriedades.

Palavras-chave: Hidrogéis. Engenharia de tecidos. Suportes porosos. *Anacardium occidentale*. Quitosana.

ABSTRACT

Tissue engineering is an interdisciplinary field that aims to develop substituents that restore, maintain, or enhance the function of a deteriorated tissue. Cashew gum is composed of a major chain of galactose bound by C-1 and C-3, with branching of galactose bound by C-1 and C-6. This binding pattern makes this gum susceptible to oxidation by the periodate ion, resulting in a derivative with two aldehyde units per monosaccharide unit, and can act as a cross-linking agent against chitosan through the formation of *Schiff* base (C=N). This work proposes the synthesis of porous support (*scaffolds*) from oxidized cashew gum and carboxyethyl chitosan (CEQ) via *Schiff* base reaction forming crosslinked gels between the two polymers. The oxidized derivatives were characterized by FTIR and GPC. The modification was confirmed by the appearance of the band at 1735 cm^{-1} in FTIR, which was attributed to the C=O bond. The introduction of the carboxyethyl group into the CEQ was also confirmed by the appearance of the band at 1771 cm^{-1} , attributed to carboxylate C-O attachment. Hydrogels were prepared by mixing the GCOx with CEQ (both at 2% concentration) in the reason for 1:1 (v / v). From the gelation time it was observed that the hydrogels had T_{gel} values of less than 5 min. Rheological analysis showed that the amount of the aldehyde groups of GCOx plays an important role in the crosslinking process. The reaction between GCOx-CEQ is favored by increasing the temperature ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $60\text{ }^{\circ}\text{C}$) in the cross-linking process. The SEM showed that the hydrogels are formed by porous structures with pores of average diameters between 63 ± 6 to $244\pm 24\text{ }\mu\text{m}$ and with a porosity of $26,8\pm 0,6$ to $69,2\pm 0,3\%$. Degradation studies in PBS showed that *scaffolds* show a slow mass loss over the 28-day period. The mechanical tests revealed a predominantly elastic behavior of the hydrogels. Thus it is possible to verify that the hydrogels present potential for application as porous supports in the regeneration of tissues, since they show good moldability of their properties.

Keywords: Hydrogel. Tissue Engineering. Porous support. *Anacardium occidentale*. Chitosan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	a) Porcentagem da população mundial com mais de 65 anos em 2050 (Nations U. World population ageing. 2002) b) Dados numéricos de transplantes realizados no período Janeiro/Março 2019.....	16
Figura 2 -	Abordagem geral de engenharia de tecidos.....	17
Figura 3 -	Diferentes formas de scaffolds poliméricos empregados na engenharia de tecidos.....	18
Figura 4 -	Unidade repetitivas da quitosana 100% desacetilada e quitina 100% acetilada.....	20
Figura 5 -	Síntese do derivado carboxietil Quitosana.....	22
Figura 6 -	Principais monossacarídeos constituintes da goma do cajueiro (a) e seu possível arranjo na estrutura do polissacarídeo (b).....	23
Figura 7 -	Padrões na reação de oxidação seletiva do periodato de sódio com unidades de carboidrato substituídas em diferentes posições. a) unidades ligadas (1→2) oxidação entre C(3) e C(4), b) unidades ligadas (1→3), não apresenta oxidação, c) unidades ligadas (1→4), oxidação entre C(2) e C(3), d) unidades ligada (1→ 6), dupla oxidação entre C(2) e C(3) e entre C(3) e C(4), e) unidades ligada em (1), dupla oxidação entre C(2) e C(3) e entre C(3) e C(4).....	25
Figura 8 -	Mecanismo de oxidação por IO ₄ ⁻ em uma unidade de galactose.....	26
Figura 9 -	Mecanismo de formação da reação Base de Schiff.....	27
Figura 10 -	Fluxograma para a síntese dos hidrogéis.....	34
Figura 11 -	Mudança no aspecto físico da solução de GCOx 50 – CEQ B observada durante o ensaio de tempo de gelificação (a) T=0 e (b) T=T _{gel}	35
Figura 12 -	Reação de oxidação de uma unidade de galactose da cadeia lateral da goma do cajueiro.....	39

Figura 13 - Representação da reação entre uma unidade de manose oxidada e NH ₂ OH.HCl.....	40
Figura 14 - Espectro de FTIR da GC não modificada e os derivados oxidados (a) e região ampliada entre 1760 a 1535 cm ⁻¹ do espectro (b).....	42
Figura 15 - Cromatograma de GPC para as amostras de goma do cajueiro (GC) e seus derivados (GCOx).....	43
Figura 16 - FTIR da Quitosana (QT) e Carboxietil Quitosana (CEQ A e CEQ B) em pastilhas de KBr.....	44
Figura 17 - Reação entre GCOx e CEQ para formação da Base de Schiff.....	46
Figura 18 - Evolução dos módulos G' e G'' com o tempo para: (a) GC-CEQ-A e (b) GCOx 20 – CEQ A na concentração de 2% (m/v) e razão de 1:1 (v/v).....	47
Figura 19 - Evolução do módulo de armazenamento (G') e de perda (G'') com o tempo para GCOx-CEQ 2% (m/v) na razão 1:1 a 37 °C. O tempo de cruzamento G' e G'' é denominado como crossover tgel (ponto de gelificação).....	48
Figura 20 - Módulos G' e G'' em função do tempo durante a gelificação dos sistemas GCOx 50 – CEQ A (a) e GCOx 50 – CEQ B (b) em diferentes concentrações.....	51
Figura 21 - Dependência do módulo elástico G' com o tempo durante o processo de gelificação da GCOx 50 – CEQ A (a) e GCOx 50 – CEQ B (b) em diferentes temperaturas.....	52
Figura 22 - Gráfico da taxa de gelificação ($\Delta G'/\Delta t$) contra o inverso da temperatura (1/T) do processo de gelificação dos sistemas GCOx-CEQ com diferentes graus de oxidação.....	53
Figura 23 - Espectro de infravermelho de CEQ A, GCOx 50 e do gel GCOx 50 – CEQ A.....	54
Figura 24 - Micrografias MEV da seção transversal dos géis de GCOx-CEQ em seus diferentes graus de oxidação: (A) GCOx20-CEQ B; (B) GCOx35 – CEQ B; (C) GCOx 50- CEQ B.....	56

Figura 25 - Valores de Porosidade, dos géis de GCOx-CEQ em diferentes razões de graus de oxidação de GCOx e substituição de CEQ.....	57
Figura 26 - Intumescimento dos hidrogéis com duas horas em PBS pH 7,4 (concentração 2% (m/v) e razão 1:1 (v/v)).....	58
Figura 27 - Cinética de degradação in vitro das diferentes formulações dos géis de GCOx-CEQ em PBS (pH=7,4) à temperatura ambiente e a 100 rpm.....	59
Figura 28 - Propriedades mecânicas dos scaffolds: (a) curva representativa de tensão-deformação compressiva dos scaffolds hidratados de GCOx 20 – CEQ B, GCOx 35 – CEQ B e GCOx 50 – CEQ B (A inserção do gráfico, representa uma ampliação da região (0-20% de tensão) usado para determinar o módulo de compressão. (b) Resumo da tensão máxima (σ_{max}) e o módulo de compressão (E)).....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre grau de oxidação teórico e quantidade de periodato de sódio.....	31
Tabela 2 - Volumes utilizados para obtenção de derivados com graus de substituição diferentes.....	33
Tabela 3 - Dados reacionais da goma do cajueiro com periodato de sódio a temperatura ambiente.....	40
Tabela 4 - Comparação dos valores da massa molar da GC e seus derivados oxidados (GCOx).....	43
Tabela 5 - Tempo de gelificação para os hidrogéis (concentração de 2% (m/v) e temperatura de 37 °C) formulados a partir de GCOx e CEQ.....	49
Tabela 6 - Valores de energia de ativação (Ea) para o processo de gelificação dos sistemas GCOx-CEQ com diferentes graus de oxidação.....	54
Tabela 7 - Intumescimento médio dos <i>scaffolds</i> em diferentes graus de oxidação da GCOx e substituição da CEQ em PBS à temperatura ambiente.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Acrílico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
CEQ	Carboxietil Quitosana
GPC	Cromatografia de permeação em gel
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
E _a	Energia de Ativação
ET	Engenharia de Tecidos
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier
SLA	Estereografia
GC	Goma do Cajueiro
GCO _x	Goma do Cajueiro Oxidado
GD	Grau de desacetilação
M _{pk}	Massa molar de pico
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
G''	Módulo de perda (módulo viscoso)
E	Módulo de armazenamento (módulo elástico)
G'	Módulo de perda
FDM	Processo de Bio-extrusão
QT	Quitosana
SLS	Sinterização a Laser
PBS	Solução Tampão fosfato salina
T _{gel}	Tempo de geleificação
$\sigma_{(máx)}$	Tensão de compressão máxima
U.a	Unidades arbitrárias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Engenharia de tecidos.....	15
1.2	Biomateriais e suportes porosos (<i>scaffolds</i>).....	17
1.3	Quitosana e carboxietilquitosana.....	19
1.4	Goma do cajueiro oxidada.....	22
1.5	<i>Scaffolds</i> obtidos por base de <i>Schiff</i>	26
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Objetivo geral.....	29
2.2	Objetivos específicos.....	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1	Materiais.....	30
3.2	Isolamento da goma do cajueiro.....	30
3.2.1	<i>Reação de oxidação da goma do cajueiro</i>	30
3.2.2	<i>Determinação do grau de oxidação</i>	31
3.3	Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	32
3.4	Purificação da quitosana.....	32
3.5	Síntese da N-carboxietil quitosana (CEQ).....	33
3.6	Espectroscopia de absorvância na região do infravermelho (FTIR)..	33
3.7	Preparo dos géis e suportes porosos de N-carboxietil quitosana (CEQ) e goma do cajueiro oxidada (GCOx).....	34
3.8	Caracterização dos géis e suportes porosos de GCOx/CEQ.....	34
3.8.1	<i>Ensaio reológicos</i>	34
3.8.2	<i>Tempo de gelificação</i>	35
3.8.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura – MEV</i>	36
3.8.4	<i>Porosidade</i>	36
3.8.5	<i>Ensaio de intumescimento</i>	37
3.8.6	<i>Teste de Degradação in vitro</i>	37
3.8.7	<i>Análise das propriedades mecânicas dos scaffolds</i>	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1	Caracterização da goma do cajueiro oxidada (GCOx).....	39
4.1.1	<i>Determinação do grau de oxidação por titulação potenciométrica</i>	39

4.1.2	<i>Espectroscopia de absorbância na região do infravermelho (FTIR)..</i>	41
4.1.3	<i>Cromatografia de permeação em gel (GPC).....</i>	42
4.2	Caracterização da carboxietil quitosana (CEQ).....	44
4.2.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR).....</i>	44
4.3	Preparação e caracterização dos géis de GCOx-CEQ.....	45
4.3.1	<i>Ensaio reológicos.....</i>	46
4.3.1.1	<i>Tempo de gelificação.....</i>	46
4.3.1.2	<i>Efeito da concentração dos polímeros.....</i>	50
4.3.1.3	<i>Efeito da temperatura.....</i>	52
4.4	Espectroscopia de absorbância na região do Infravermelho (FTIR) dos géis de GCOx-CEQ.....	54
4.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	55
4.6	Porosidade.....	56
4.7	Ensaio de Intumescimento.....	58
4.8	Teste de degradação <i>in vitro</i>.....	59
4.9	Análise das propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i>.....	60
5	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	APÊNDICE A – MÓDULO G' E G'' EM FUNÇÃO DO TEMPO DURANTE A GELIFICAÇÃO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES...	74
	APÊNDICE B – MÓDULO ELÁSTICO G' EM FUNÇÃO DO TEMPO DURANTE O PROCESSO DE GELIFICAÇÃO DOS SISTEMAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	75
	APÊNDICE C – MÉDIA DOS DIÂMETROS DE POROS PARA GÉIS DE DIFERENTES GRAUS DE OXIDAÇÃO DA GCOX.....	76

1 INTRODUÇÃO

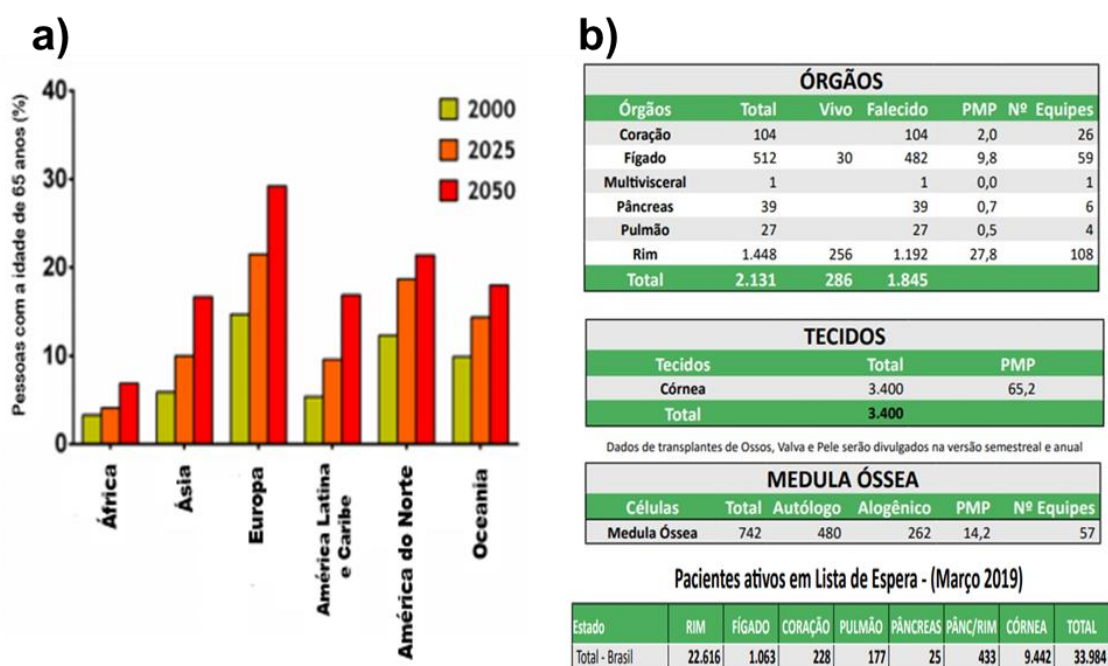
1.1 Engenharia de tecidos

Desde a antiguidade, os seres humanos vêm buscando uma maior longevidade com uma melhor qualidade de vida. Segundo Nations U. World 2002, como mostrado na Figura 1a, é esperado que até o ano de 2050 aconteça um aumento na expectativa de vida mundial, desencadeando o aumento do número de doenças e lesões relacionadas ao envelhecimento da população. Conseqüentemente, surgiu a necessidade de desenvolver e manipular moléculas, células, tecidos e órgãos crescidos em laboratório para substituir ou apoiar a função de partes do corpo com falhas ou danos ocasionados por defeitos como resultado de acidentes ou doenças (SINGH; SINGH; HAN, 2016).

Uma outra problemática que pode ser citada é a demanda crescente de órgãos de doadores para atender as necessidades das pessoas em lista de espera que provavelmente nunca serão atendidas. Segundo a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO) como mostrado na Figura 1b, foram realizados 4.144 transplantes de órgãos sólidos, tecidos e medula óssea no período compreendido entre janeiro e março de 2019. Em março deste ano a ABTO tinha 33.984 pacientes registrados na lista de espera. A necessidade de órgãos ou tecidos não pode ser atingida através de métodos tradicionais de transplante. A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa podem mudar esse cenário (HOSSEINKHANI; HONG; YU, 2012).

Segundo Langer e Vacanti (1993) a Engenharia de tecidos (ET) é vista hoje "como um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida ao desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função de um tecido ou um órgão inteiro". Três abordagens têm sido adotadas para a criação de novos tecidos (tríade da engenharia de tecidos), que são: através da combinação celular, a utilização de moléculas bioativas tais como fatores de crescimento ou drogas e os suportes para crescimento celular (*scaffolds*) (LANGER; VACANTI, 1993).

Figura 1 – a) Porcentagem da população mundial com mais de 65 anos em 2050 (Nations U. World population ageing, 2002) b) Dados numéricos de transplantes realizados no período Janeiro/Março - 2019.

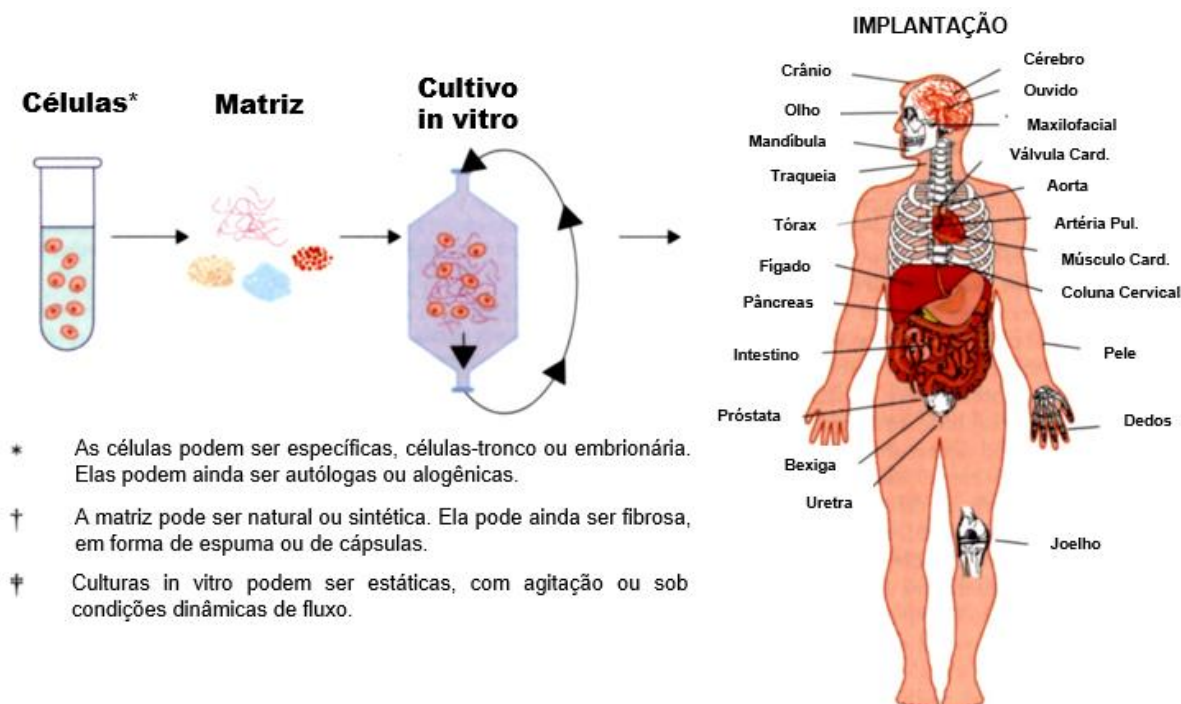


Fonte: próprio autor.

O baixo número de doadores e transplantes de órgãos, aliado a uma grande necessidade de reparar ou substituir tecidos vivos, tem contribuído para o avanço da ET nas últimas décadas. Uma alternativa de reverter essa situação é a utilização das células dos próprios pacientes junto a um material biocompatível, biodegradável e provisório, que tenha como função promover um crescimento celular e tecidual, diminuindo os riscos de rejeições, um menor tempo de espera para realização do transplante e uma cirurgia minimamente invasiva (NAAHIDI *et al.*, 2017).

A Figura 2 ilustra uma abordagem geral para a ET. Inicialmente para a criação de um tecido substituto vivo, um pequeno número de células é colhido do paciente usando uma técnica de biópsia e então cultivado para um número apropriado em laboratório. Estas células podem ser expandidas para uma matriz (*scaffolds*) tridimensional, natural ou sintética, na presença de fatores de crescimento e de diferenciação. Se providos das condições adequadas, as células secretarão componentes da matriz extracelular (MEC) e criarão tecidos novos que serão usados como o tecido substituto, Por fim a matriz tridimensional deve se degradar para não haver resposta imunológicas a longo prazo (LANGER, 2000).

Figura 2 - Abordagem geral de engenharia de tecidos.



Fonte: Adaptado de Langer 2000.

1.2 Biomateriais e suportes porosos (*scaffolds*)

A humanidade tem utilizado biomateriais desde a antiguidade, utilizando próteses tidas como simples com o objetivo de substituir ou recuperar tecidos danificados por alguma enfermidade (OGRETMEN, 2017). Com o passar do tempo esses materiais sofreram processos de adaptação com o intuito de aperfeiçoar e facilitar seu desempenho, até que no século XX houve o surgimento dos materiais sintéticos, como amálgamas de metais e as cerâmicas que auxiliaram em uma maior evolução desses biomateriais (HUEBSCH; MOONEY, 2009).

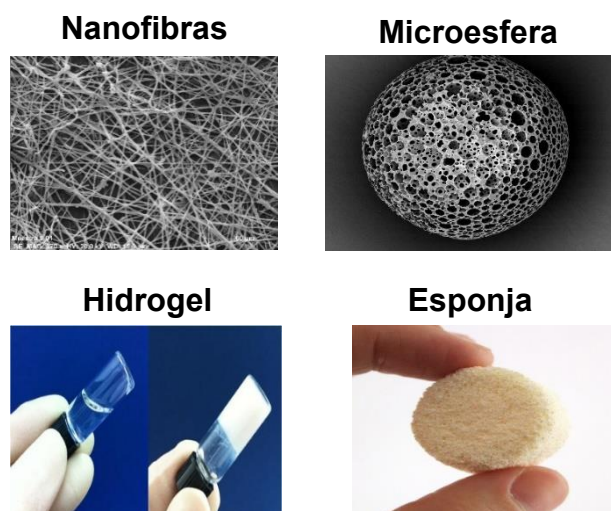
O desenvolvimento dos biomateriais foi um marco importante para o avanço da ET. Esse termo foi definido pela primeira vez em 1976 durante uma conferência da Sociedade Europeia de Biomateriais, para descrever um material de origem não viva, utilizado em um dispositivo médico, destinado a interagir com sistemas vivos (WILLIAMS, 1987). Contudo, essa definição trouxe controvérsias por estar relacionada a materiais não-vivos, fazendo com que a definição atual de biomateriais fosse alterada para: “material destinado a interagir com sistemas

biológicos para tratar, avaliar, aumentar ou substituir qualquer órgão, tecido ou função do corpo” (WILLIAM *et al.*, 1992).

Existem variados materiais que são utilizadas na ET como: metais, cerâmicas, compósitos e polímeros. Essas classes de materiais são empregadas para a fabricação de estruturas porosas mais conhecidos como “*scaffolds*”, termo de origem inglesa, que tem como significado andaime, suporte poroso ou matriz tridimensional porosa, cuja função é a hospedagem de componentes biológicos e o armazenamento das células do indivíduo para que elas possam proliferar, diferenciar, sintetizar e regenerar novos tecidos que antes foram lesionados (IKADA, 2006).

Os *scaffolds* podem possuir diversos formatos, dimensões e propriedades. Na Figura 3 são apresentados *scaffolds* em suas diferentes formas como: *scaffolds* fibrosos (nanofibras), *scaffolds* porosos (suporte porosos), hidrogéis e *scaffolds* constituídos por microesferas (CHAUDHURY *et al.*, 2014).

Figura 3 - Diferentes formas de *scaffolds* poliméricos empregados na engenharia de tecidos.



Fonte: Adaptado de Chung e Park, 2007.

Os *scaffolds* devem ser construídos para auxiliar no aumento da distribuição celular, como também no desenvolvimento de novos tecidos que serão regenerados a partir de tecidos lesionados (MA, 2004). Desta forma os suportes porosos devem obedecer diversos critérios para manter as funções para as quais eles foram projetados, como por exemplo: promover as interações célula-biomaterial, a adesão celular e a deposição da matriz extracelular (MEC); permitir o transporte eficiente de gases, nutrientes e fatores de regulação que permitam a sobrevivência

celular, a proliferação e a diferenciação; ser biodegradável a uma taxa controlável que se aproxime da taxa de regeneração de tecidos sob as condições de cultura de interesse; apresentar biocompatibilidade para não gerar reações que manifestem inflamação ou toxicidade *in vivo* e propriedades mecânicas apropriadas às funcionalidades que foram produzidas (TABATA, 2009).

Na atualidade existem diferentes técnicas para a produção desses materiais porosos que são divididas em duas categorias, os métodos convencionais: formação de espumas, liofilização, evaporação de solvente/lixiviação de partículas, separação de fases, formação de fibras entre outras, e os métodos avançados: a estereolitografia (SLA), a sinterização Laser (SLS), o processo de bio-extrusão (FDM) e a impressão 3D (LI, 2013).

Os polímeros naturais como proteínas (colágeno, gelatina, elastina, actina, queratina, miosina e proteínas da seda), polissacarídeos (celulose, amilose, dextrana, quitina e glucosaminoglicanos) e polinucleótidos (ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA)), estão entre os compostos que normalmente são mais utilizados na ET (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011). Estes são utilizados principalmente na construção de suportes porosos que são aplicados na substituição de vários tipos de tecidos (cartilagem, osso, menisco, ligamentos, discos intervertebrais, entre outros), pois apresentam uma alta biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesão e bioatividade. Contudo, os polímeros naturais apresentam desvantagens como por exemplo baixa propriedade mecânica e rápida degradação, o que limita sua aplicação na ET (BRATLIE; ACCEPTED, 2018).

1.3 Quitosana e carboxietilquitosana

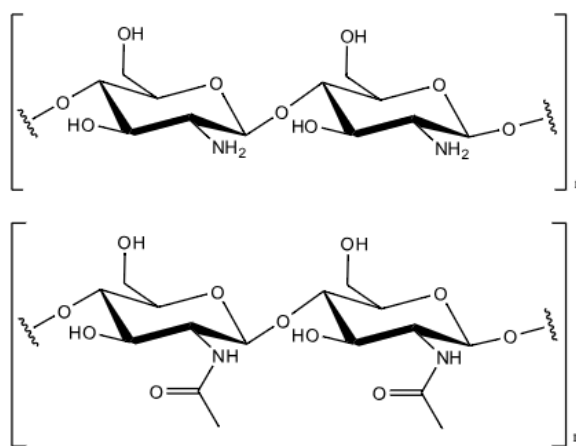
A quitosana é um polissacarídeo natural muito utilizado na engenharia de tecidos para a produção de *scaffolds* devido a suas propriedades bastantes conhecidas como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, não antigenicidade, bioadesão e propriedades de adsorção (AHMED; ALJAEID, 2016). A quitosana é um copolímero de unidades N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas β -(1→4) e disponível em diferentes graus de desacetilação (MOREIRA *et al.*, 2016; ZENG *et al.*, 2012). A

quitosana é um polímero que contém um grupo amino e dois grupos hidroxila por cada unidade glicosídica desacetilada (DASH *et al.*, 2011).

A quitosana é um polissacarídeo obtido seja por tratamento enzimático ou por um tratamento térmico alcalino da quitina, onde as unidades N-acetil sofrem uma desacetilação parcial, acarretando na formação de grupos amino em seu lugar (ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015). A quitina é o segundo biopolímero mais abundante da natureza atrás somente da celulose, principal composto encontrado nos exoesqueletos de insetos e carapaças de crustáceos como o camarão e lagosta (MUZZARELLI, 1973).

A Figura 4 mostra a semelhança entre a estrutura química da quitina e quitosana, mudando somente a quantidade de unidades acetiladas. Segundo Abran e Higueira (2004), se na estrutura química houver uma quantidade acima de 80% de unidades acetiladas, o polissacarídeo será denominado quitina, mas se na estrutura houver uma porcentagem menor que 80% de unidades acetiladas, tem-se o polissacarídeo quitosana.

Figura 4 - Unidade repetitivas da quitosana 100% desacetilada e quitina 100% acetilada.



Fonte: próprio autor.

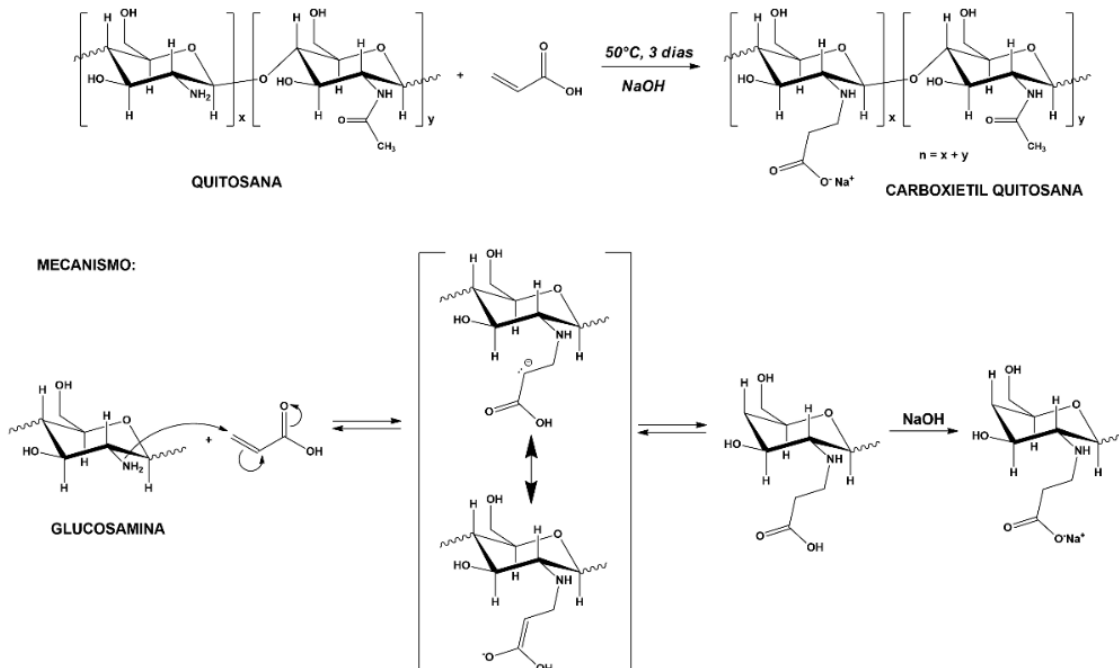
A quitina tem aplicações limitadas devido sua baixa solubilidade em soluções aquosas e solventes orgânicos. Em contraste, a quitosana apresenta uma maior versatilidade devido à sua solubilidade em meios ácidos (pH < 6,0). Os ácidos utilizados para sua dissolução incluem ácidos inorgânicos como HCl e ácidos orgânicos como ácido acético e ácido láctico. Quitosana é insolúvel em meio neutro e alcalino. O mecanismo de solubilização da quitosana envolve a protonação dos

grupos amino nas unidades glucosamina (BASHIR *et al.*, 2015). Entretanto, em se tratando de aplicações biomédicas é necessário que a quitosana seja solúvel em pH do meio fisiológico (7,4), e isto pode ser conseguido através da modificação de sua estrutura pela inserção ou formação de grupos hidrofílicos. Jayakumar *et al.* (2010) elaboraram um levantamento bibliográfico citando algumas metodologias disponíveis para produção de derivados solúveis em solução aquosa da quitina e da quitosana. As modificações citadas neste trabalho são possíveis devido ao caráter nucleofílico do nitrogênio da amina e do oxigênio das hidroxilas para atacar reagentes que possuem regiões eletrofílicas, tais como: ácido glioxílico, ácido monocloroacético, ácido levulínico, dentre outros.

Aumenta-se cada vez mais a busca por diferentes derivados de quitosana que sejam solúveis em água, pois esses materiais ampliam a possibilidade de novas aplicações desse polissacarídeo na área de biomateriais. Vários trabalhos vem sendo publicados utilizando o mecanismo de adição de Michael e utilizando principalmente diferentes solventes como o metacrilato (AL-KARAWI *et al.*, 2014) e o acrilato de etila (MALEKI, PAJOOTAN E HAYATI, 2015). Contudo, essas reações utilizam solventes orgânicos como ácido acético e o metanol. Além do mais, a saponificação do grupo éster é necessária para se obter derivados de quitosana solúveis em água. Portanto, o principal objetivo de utilizar a reação do ácido acrílico nesse trabalho em contato direto com a quitosana pela reação de adição de Michael é diminuir a potencial toxicidade do derivado, gerando assim uma síntese menos agressiva.

A reação de síntese da carboxietilquitosana (CEQ) com diferentes graus de substituição é classificada como uma adição de Michael, na qual o grupo amina da quitosana age como doador de Michael (nucleófilo) e o carbono β do ácido acrílico age como receptor de Michael (eletrófilo). Após a reação entre a quitosana e o ácido acrílico (Figura 5) obtêm-se o aduto de Michael na forma protonada (-COOH) (YANG *et al.*, 2016). Em seguida é feita a adição de NaOH ao meio reacional que promove a desprotonação do grupo carboxila (COOH) formando assim o grupo carboxilato (-COO⁻) que torna o derivado mais solúvel em meio aquoso (VANICHVATTANADECHA *et al.*, 2010).

Figura 5 - Síntese do derivado carboxietil quitosana.



Fonte: próprio autor.

1.4 Goma do cajueiro oxidada

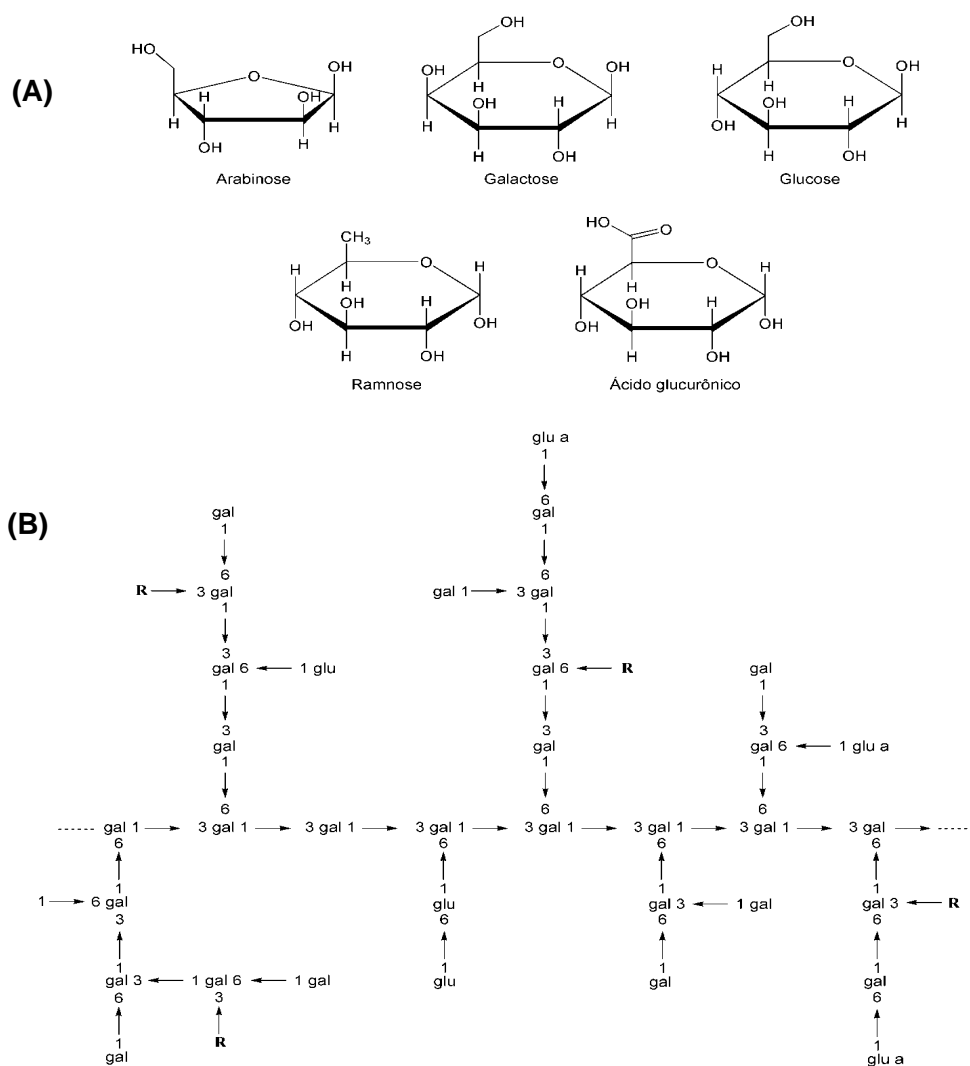
Assim como a quitosana, a goma do cajueiro (GC) também é um polissacarídeo natural. Ela é obtida a partir do exsudato extraído da árvore *Anacardium Occidentale*. Ela é uma árvore bastante rústica, originária da América tropical, podendo chegar até 12 metros de altura. É bastante abundante em países tropicais como o Brasil, principalmente no nordeste brasileiro, como Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte.

O Grupo de Polímeros – UFC tem estudado essa goma desde 1993 (RODRIGUES; PAULA; COSTA, 1993). A goma extraída de árvores do nordeste brasileiro, foi caracterizada como um heteropolissacarídeo contendo β -D-galactose (72-73%), α -D-glucose (11-14%), arabinose (4,6-5%), ramnose (3,2-4%) e ácido glucurônico (4,7-6,3%) em porcentagem de massa (DE PAULA; RODRIGUES, 1995; PAULA; HEATLEY; BUDD, 1998). A goma é composta de uma cadeia principal de galactose ligada por C-1 e C-3, com ramificações de galactose ligada por C-1 e C-6.

A glucose pode formar cadeias laterais e a arabinose, ramnose e ácido glucurônico apresentam-se como grupos terminais (PAULA; HEATLEY; BUDD, 1998).

A Figura 6 apresenta as unidades monossacarídicas que compõem a goma do cajueiro do Nordeste (a) e uma possível representação da estrutura de um segmento do polissacarídeo do exsudato da goma do cajueiro (b).

Figura 6 - Principais monossacarídeos constituintes da goma do cajueiro (a) e seu possível arranjo na estrutura do polissacarídeo (b).



Fonte: Cunha *et al.* (2007)

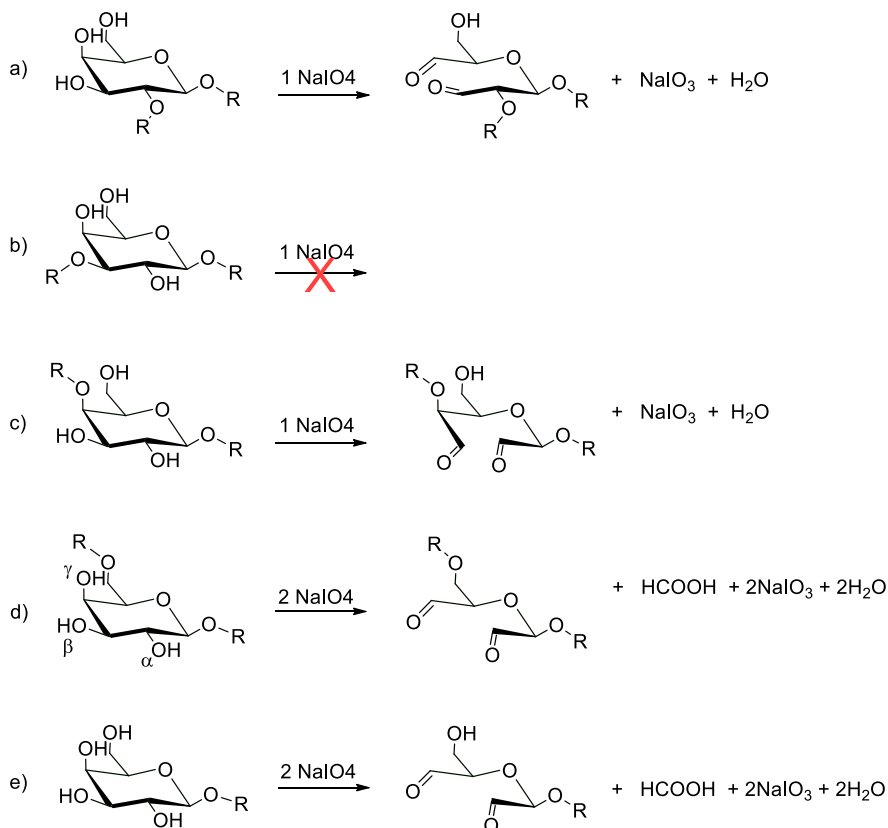
A goma do cajueiro apresenta em sua cadeia uma rica quantidade de hidroxilas (OH). Estes grupos podem ser facilmente modificados gerando vários tipos de derivados que ampliam suas propriedades e aplicações. A seguir são mostradas algumas derivatizações normalmente utilizadas como: a quaternização (QUELEMES

et al., 2017), sulfatação (DE MOURA NETO *et al.*, 2011; MOURA NETO *et al.*, 2014), acetilação (PITOMBEIRA *et al.*, 2015), oxidação utilizando o reagente TEMPO (CUNHA *et al.*, 2007) e periodato de sódio (LEITE *et al.*, 2017).

Entre os derivados citados destaca-se a oxidação com íon periodato, que é considerada uma técnica clássica e simples. A reação se processa sem a utilização de catalisadores e os produtos resultantes da reação são isolados na etapa de diálise (MAIA *et al.*, 2011).

O íon periodato tem preferência na oxidação de polissarídeos (oxidação seletiva), pois para que ocorra a reação de oxidação é fundamental que a unidade monossacarídica presente em sua estrutura dióis vicinais (hidroxilas vizinhas) para levar à introdução de grupos aldeídicos nas cadeias. Assim, quando na cadeia principal do polissacarídeo as unidades glicosídicas são ligadas (1→3) não há presença de hidroxilas vicinais (Figura 7b), a oxidação se dará exclusivamente pela introdução dos grupamentos aldeídicos nas cadeias laterais do polissacarídeo, não ocorrendo a degradação de sua cadeia principal. Na Figura 7d e 7e cada unidade pode ser duplamente oxidada por conterem em sua unidade glicosídica três hidroxilas vicinais. Essa reação irá ocorrer com liberação de 1 mol de ácido fórmico e consumo de 2 mol de periodato. A Figura 7 mostra os diferentes padrões que podem ocorrer na reação de oxidação, frente a seletividade dos íons periodato nas unidades glicosídicas (KRISTIANSEN; POTTHAST; CHRISTENSEN, 2010).

Figura 7 - Padrões na reação de oxidação seletiva do periodato de sódio com unidades de carboidrato substituídas em diferentes posições. a) unidades ligadas (1→2) oxidação entre C(3) e C(4), b) unidades ligadas (1→3), não apresenta oxidação, c) unidades ligadas (1→4), oxidação entre C(2) e C(3), d) unidades ligada (1→ 6), dupla oxidação entre C(2) e C(3) e entre C(3) e C(4), e) unidades ligada em (1), dupla oxidação entre C(2) e C(3) e entre C(3) e C(4).



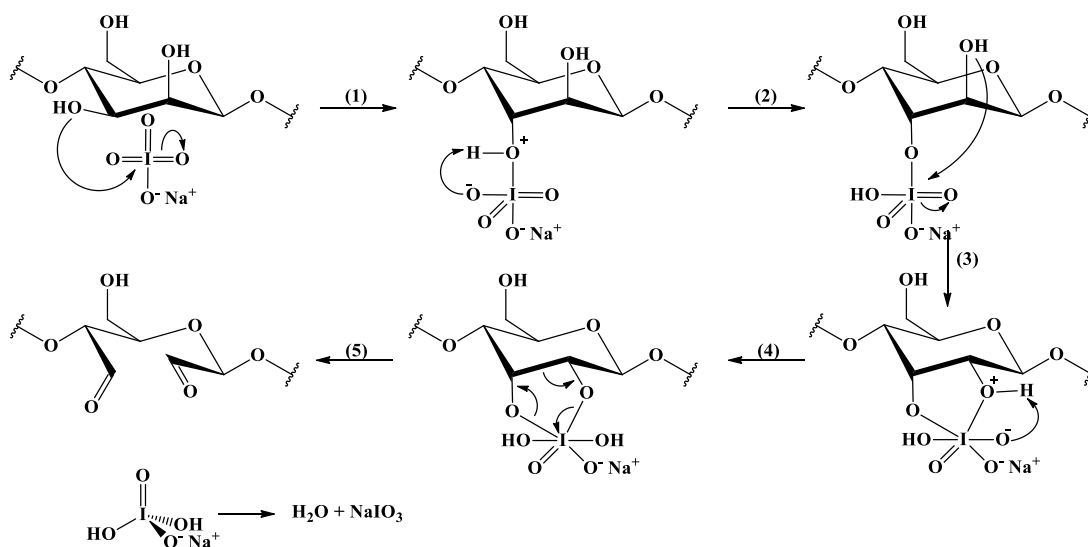
Fonte: Adaptado de Kristiansen, Potthast, Christensen, 2010.

A Figura 8 apresenta o mecanismo de oxidação utilizando o periodato de sódio, onde pode-se notar que a etapa determinante para a oxidação com o íon periodato envolve a formação de um éster iodato cíclico intermediário composto de 5 membros, ocorrendo logo em seguida uma clivagem de ligação concertada para gerar os grupamentos aldeídos (WANG *et al.*, 2013). Para que ocorra a reação de oxidação, é essencial que os grupos OH estejam orientados em uma posição definidas como equatorial-equatorial ou axial-equatorial. Diois vicinais em uma posição rígida trans diaxial não podem reagir, por que a formação do complexo intermediário não ocorrerá (KRISTIANSEN; POTTHAST; CHRISTENSEN, 2010).

Há a possibilidade de que cada unidade glicosídica seja duplamente oxidada, sendo que na primeira oxidação ocorre a abertura do anel piranosídico com a formação dos grupos aldeídicos e na segunda oxidação ocorre a liberação do ácido fórmico a partir da estrutura já oxidada, sendo que muitas vezes os valores de

oxidação real não são iguais ao teórico (KRISTIANSEN; POTTHAST; CHRISTENSEN, 2010).

Figura 8 - Mecanismo de oxidação por IO_4^- em uma unidade de galactose.



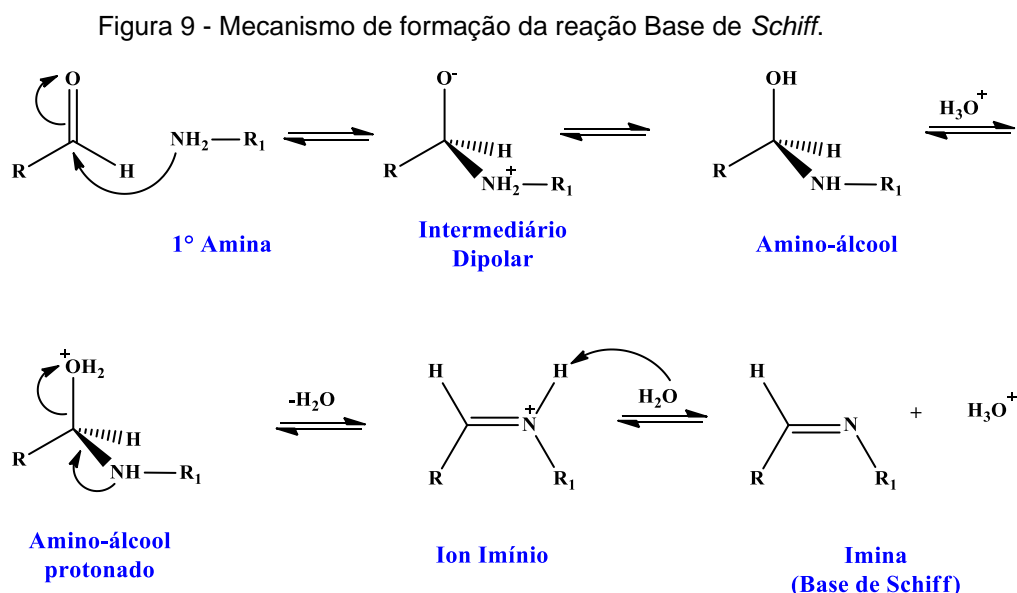
Fonte: próprio autor.

Nos últimos anos, a oxidação de polissacarídeos utilizando periodato de sódio vem sendo extensivamente utilizado, pois introduz grupos funcionais aldeídicos ao longo da cadeia do polissacarídeo, tornando-o capaz de atuar como um agente reticulador macromolecular para polímeros que contenham em sua estrutura grupos N-nucleófilos (quitosana, gelatina, entre outros) através da formação de uma ligação covalente imina ($\text{C}=\text{N}$) ou mais conhecida como Base de *Schiff* (MAIA *et al.*, 2011).

1.5 Scaffolds obtidos por base de *Schiff*

A reação base de *Schiff* foi proposta no ano de 1864 pelo químico alemão Hugo Schiff (JIA; LI, 2015; SCHIFF, 1864). A base de *Schiff* (também conhecida como imina) apresenta em sua estrutura $\text{R}_2\text{C}=\text{NR}'$ ($\text{R}' \neq \text{H}$). Essa reação é formada a partir da adição nucleofílica de uma amina primária a um grupo carbonila de uma acetona ou aldeído, formando hemiaminais, análogos nitrogenados do hemiacetais (LI *et al.*, 2014). Esses hemiaminais sofrem facilmente o processo de desidratação (perda de água), gerando assim uma ligação dupla carbono-nitrogênio ($\text{C}=\text{N}$), também conhecida de imina ou Base de *Schiff*.

A Figura 9 apresenta o mecanismo de formação da Base de *Schiff* a partir de uma amina e um aldeído.



Fonte: Solomos e Fryhle, Vol. 2., 2006.

A reação da Base de *Schiff* tem sido bastante utilizada para sintetizar novos materiais como hidrogéis injetáveis e suportes porosos para aplicação na engenharia de tecidos, pois essa reação acontece sob circunstâncias moderadas e principalmente se processa em condições ambientes, tendo exclusivamente água como subproduto (JIA; LI, 2015; LI *et al.*, 2015a, 2015b). A utilização da Base de *Schiff* como agente macro reticulante na produção dos *scaffolds* evita a necessidade de se utilizar agentes reticulantes tóxicos como o glutaraldeído e o hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, que podem acabar causando uma resposta indesejada para o tecido a ser regenerado (KHUNMANEE; JEONG; PARK, 2017). Uma outra vantagem é sua rápida reticulação e uma excelente biocompatibilidade (HOZUMI *et al.*, 2018). Os *scaffolds* que são obtidos através dessa reação exibem uma reversibilidade com a mudança dos valores de pH, fazendo com que sua estabilidade no meio acabe diminuindo com o decréscimo do pH, acarretando assim a degradação do material com o passar do tempo (XIN; YUAN, 2012). Essas propriedades combinadas, são de vital importância, pois estão relacionadas intrinsecamente aos critérios básicos para utilização de suportes porosos no campo biomédico e na engenharia de tecidos.

Várias pesquisas recentes foram publicadas utilizando a reação de Base de *Schiff* envolvendo polímeros naturais como, por exemplo, quitosana (HASSAN *et al.*, 2018), gelatina e ácido hialurônico (HOZUMI *et al.*, 2018), alginato de sódio (YUAN *et al.*, 2017), dextrana (SU *et al.*, 2018), dentre outros. Essa reação também é utilizada em diversos campos de aplicação visando a produção de novos materiais para, potencializar a atividade microbianas de polímeros naturais como quitosana (HASSAN *et al.*, 2018), liberação controlada de fármacos (LIU *et al.*, 2018), engenharia de tecidos (DENG *et al.*, 2017) e auxílio na formação de complexos metálicos (KADWA; FRIEDRICH; BALA, 2017).

Neste trabalho é proposta a fabricação de um suporte poroso (*scaffolds*) a partir da formação da base de *Schiff* entre os grupamentos aldeídicos do derivado oxidado da goma do cajueiro e os grupamentos amino da carboxietilquitosana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar suportes porosos (*scaffolds*) à base de goma do cajueiro oxidada (*Anacardium occidentale*) e carboxietilquitosana com potencial aplicação na engenharia tecidual.

2.2 Objetivos específicos

Modificar a goma do cajueiro (GC) isolada por oxidação com periodato de sódio (NaIO₄) em diferentes graus de oxidação;

Caracterizar os derivados oxidados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) e cromatografia de permeação em gel (GPC);

Modificar a quitosana para se obter derivados hidrossolúveis através da reação de adição de Michael obtendo-se a carboxietilquitosana (CEQ) e caracterizá-la por FTIR;

Sintetizar suportes porosos (*scaffolds*) a partir da GCOx/CEQ (com a GCOx de diferentes graus de oxidação e CEQ com diferente grau de substituição), através da reticulação via formação de Base de *Schiff*;

Avaliar o efeito da concentração, da temperatura e da razão dos polissacarídeos na reologia para obtenção da melhor condição para a obtenção da estrutura porosa;

Caracterizar os suportes porosos obtidos por ensaio de intumescimento, degradação, análise mecânica, porosidade por infiltração de etanol, tempo de gelificação, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de absorção na região de infravermelho (FTIR).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A goma do cajueiro (GC) foi extraída do exsudato bruto do cajueiro (*Anacardium occidentale*), fornecido pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Ceará. Os solventes empregados foram: Álcool etílico e acetona (Synth). Os reagentes utilizados foram: etilenoglicol (CH₂OHCH₂OH), cloridrato de hidroxilamina (NH₂OH·HCl), hidróxido de sódio, fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) e fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) (Vetec); periodato de sódio (NaIO₄) (Dinâmica); Ácido Acrílico (Synth) e quitosana com grau de desacetilação de 81% (determinado por RMN), cedida pela Polymar.

3.2 Isolamento da goma do cajueiro

A GC foi isolada a partir da metodologia descrita por Rodrigues, Paula e Costa, (1993). Foram pesados 10 g de exsudato triturado e adicionados 100 mL de água destilada a solução foi deixada sob agitação por 24 horas. A solução a partir do exsudato foi filtrada em funil de placa sinterizada número 1, com o intuito de se remover resíduos. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 0,1 mol L⁻¹, com posterior adição de 1 g de NaCl, para o ajuste da força iônica e uma melhor precipitação. A solução foi precipitada em etanol e o precipitado foi filtrado em funil de placa sinterizada, lavado com etanol e acetona, e secado com jato de ar quente.

3.2.1 Reação de oxidação da goma do cajueiro

A goma do cajueiro foi oxidada pela metodologia descrita por Gomez, Rinaudo e Villar, (2007), com pequenas modificações. A conversão dos grupos OH a grupos CHO nas unidades monossacarídicas da GC foi realizada usando periodato de sódio como agente oxidante. Brevemente, 1,0 g ($6,2 \times 10^{-3}$ mol de unidades monossacarídicas) de GC foi dissolvido em 100 mL de água destilada e agitada por 24 h para completa dissolução. A esta solução foi adicionada periodato de sódio,

suficiente para oxidar 20%, 35% e 50% das unidades monossacarídicas. Os valores utilizados são encontrados na Tabela 1.

O sistema foi coberto com uma folha de alumínio para prevenir a decomposição fotoinduzida do íon periodato (DAWLEE *et al.*, 2005) e a reação se processou por 24 h. Em seguida foi adicionado 1,0 mL de etilenoglicol para cessar a reação. A solução resultante foi dialisada contra água destilada por 3 - 4 dias em membrana de celulose com limite de exclusão de $12.400 \text{ g mol}^{-1}$, e em seguida o derivado oxidado foi seco por liofilização. O desaparecimento do periodato no dialisado foi acompanhado pela condutância da água. Assim foram obtidos os derivados com graus de oxidação de 20%, 35% e 50%, sendo nomeados GCOx 20, GCOx 35 e GCOx 50, respectivamente.

Tabela 1 - Relação entre grau de oxidação teórico e quantidade de periodato de sódio.

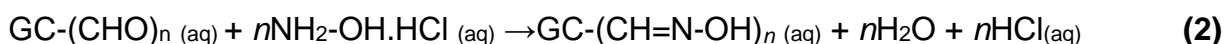
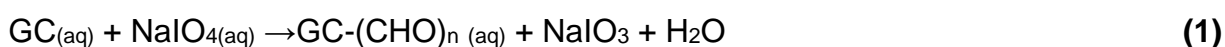
Produto	Grau de Oxidação teórico (%)	Mol de NaIO_4 / mol de unidades GC
GCOx 20	20	$1,23 \times 10^{-3}$
GCOx 35	35	$2,16 \times 10^{-3}$
GCOx 50	50	$3,08 \times 10^{-3}$

Fonte: próprio autor.

3.2.2 Determinação do grau de oxidação

Para quantificar o grau de oxidação da GCOx 20%, GCOx 35% e GCOx 50%, isto é, a porcentagem de unidades monossacarídeas oxidadas, determinou-se o teor de grupos aldeídicos na estrutura usando o método de titulação por meio do cloridrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) (ZHAO E HEINDEL, 1991). Dissolve-se aproximadamente 100 mg de CGOx liofilizada em 25 mL de cloridrato de hidroxilamina $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação durante 24 h em temperatura ambiente. O ácido clorídrico liberado após a conversão de aldeídos em oximas ($\text{C}=\text{N}-\text{OH}$) foi determinado por titulação potenciométrica com uma solução de NaOH $0,0989 \text{ mol L}^{-1}$, padronizado com biftalato de potássio. Registrou-se todas as mudanças do pH com a adição de volumes de NaOH $0,0989 \text{ mol L}^{-1}$. O número de mols de aldeídos presentes nas amostras oxidadas é equivalente ao número de mols de NaOH. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

Apresenta-se a seguir as equações químicas das reações envolvidas no processo de oxidação, titulação e neutralização.



Para realização da determinação do grau de oxidação das unidades monossacarídeas, utilizou-se a Equação 4:

$$\text{Grau de oxidação (\%)} = \frac{C_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \times 162}{2m_p} \times 100 \quad (4)$$

Onde C é a concentração (mol L^{-1}) e V o volume (L) do NaOH, m_p é a massa pesada de CGOx (g) e 162 é a massa molar (g mol^{-1}) da unidade monossacarídea de galactose (YAN *et al.*, 2014).

3.3 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A massa molar de pico (M_{pk}) da Goma do cajueiro e de seus derivados oxidados foi estimada por cromatografia de permeação em gel utilizando um cromatógrafo Shimadzu LC-20 AD com detector de índice de refração RID-10. As análises foram realizadas com coluna linear PolySep (7,8 mm x 300 mm), fluxo de 1,0 mL/min de NaNO_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), sendo injetado o volume de 50 μL para cada análise. As amostras foram preparadas na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e filtradas em membrana MILLIPORE 0,45 μm . As massas molares foram estimadas pela curva padrão de calibração de pululanas (Shodex P-82) com massa molar de $5,9 \times 10^3$ a $7,88 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$.

3.4 Purificação da quitosana

A quitosana foi purificada segundo a metodologia descrita por Nasti *et al.* (2009), com algumas modificações. 5,0 g de quitosana foram dissolvidas em 500 mL de ácido acético 2% (v/v), e deixada sob agitação por 24 horas para uma completa

dissolução. Posteriormente, a solução foi filtrada em funil Nº 3 para remoção de impurezas e fervida por 15 min. Após fervura, a solução foi centrifugada (30 min, 6000 rpm). O sobrenadante foi coletado e o pH ajustado para 9,0 com NaOH 1 mol L⁻¹ para precipitação da quitosana. A quitosana precipitada foi recuperada por centrifugação e lavada com água deionizada para retirar o excesso de NaOH. A amostra foi liofilizada e armazenada a 4°C para posterior utilização.

3.5 Síntese da N-carboxietil quitosana (CEQ)

Os derivados solúveis da quitosana foram sintetizados segundo metodologia descrita por Qu *et al.* (2017), com pequenas modificações. Foram utilizados dois sistemas com balões de fundo redondo. A cada um deles foram adicionados volumes distintos (Tabela 2) de ácido acrílico (AA) em 50 mL de água destilada. Logo após 1 g de QT purificada foi adicionado em cada sistema, com o objetivo de se obter dois graus de substituição teórico de 50% e 12,5%. As misturas foram mantidas sob agitação magnética constante por 72 h a 50 °C em banho de glicerina. Em seguida o pH foi ajustado para 10-12 com uma solução aquosa de NaOH 1 mol L⁻¹. A solução foi precipitada em etanol comercial e o sólido foi lavado três vezes com acetona e etanol PA e seco em estufa por 14 h.

Tabela 2 - Volumes utilizados para obtenção de derivados com graus de substituição diferentes.

Volume de AA (mL)	Nomenclatura
1,46	^a CEQ-A
0,365	^b CEQ-B

^a Carboxietil Quitosana alta substituição

^b Carboxietil Quitosana baixa substituição.

Fonte: próprio autor.

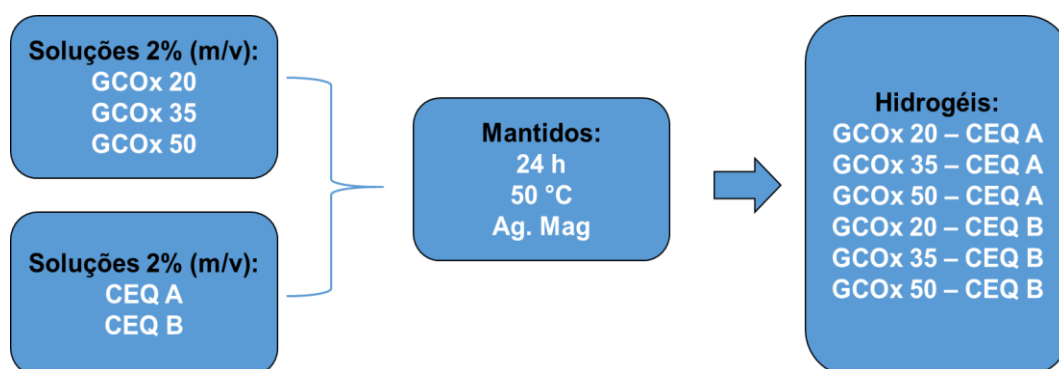
3.6 Espectroscopia de absorvância na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro de infravermelho FTIR da Shimadzu modelo IRTracer-100 operando na faixa de 400-4000 cm⁻¹. Para obtenção dos espectros, as amostras trituradas foram misturadas a brometo de potássio (KBr) para preparação de pastilhas.

3.7 Preparo dos géis e suportes porosos de N-carboxietil quitosana (CEQ) e goma do cajueiro oxidada (GCOx)

Foram preparadas soluções aquosas de GCOx 20% ,35% e 50% e CEQ A e CEQ B ambas na concentração de 2% (m/v). As soluções foram levadas para agitação magnética e mantidas a 50 °C por 24 h para uma melhor solubilização do material. A temperatura dos percursos foi reduzida para 37 °C e em seguida os hidrogéis foram preparados nas combinações das soluções mostradas na Figura 10. Foi adicionado 1 mL da solução de GCOx sobre 1 mL de CEQ resultando na razão de volume 1:1. Utilizou-se um frasco cilíndrico de 2,5 cm de diâmetro por 3,5 cm de altura para armazenar os hidrogéis. Os frascos foram deixados à temperatura ambiente por 24 h para garantir uma completa gelificação da amostra e em seguida mantidos a – 80° C em Ultra low freezer Nuair por 24 h. Posteriormente os hidrogéis foram liofilizados no próprio frasco cilíndrico.

Figura 10 - Fluxograma para a síntese dos hidrogéis.



Fonte: próprio autor.

3.8 Caracterização dos géis e suportes porosos de GCOx/CEQ

3.8.1 Ensaios reológicos

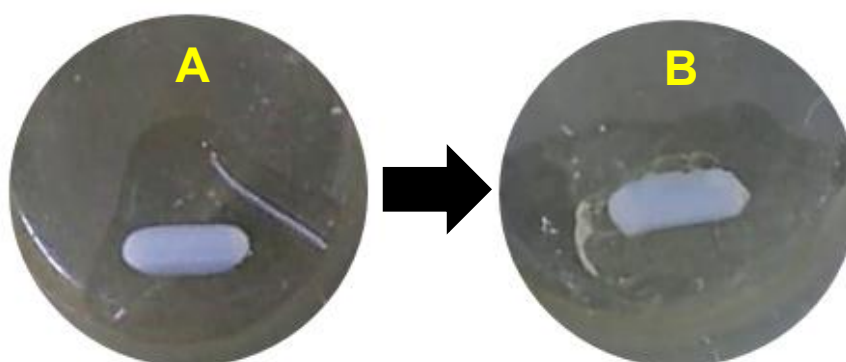
Todas as medidas reológicas foram realizadas em um reômetro AR 550 da TA Instrument. Os experimentos foram realizados com geometria cone-placa (diâmetro de 40 mm, ângulo de 1°, gap 28 µm), com temperatura constante de 37 °C. Para evitar perda de água, utilizou-se óleo mineral que foi adicionado ao redor da

geometria. Para teste de varredura de tempo a diferentes temperaturas, concentrações, razões de volume e graus de oxidação, o módulo de armazenamento G' e módulo de perda G'' foram monitorados em função do tempo a uma frequência de 1 Hz e tensão de cisalhamento de 5 Pa.

3.8.2 Tempo de gelificação

O tempo de gelificação foi determinado por dois métodos diferentes (Barra Magnética e por análise reológica). No método da barra magnética foi realizado o seguinte procedimento para as soluções poliméricas (BALAKRISHNAN *et al.*, 2014). 150 μL de uma solução aquosa de GCOx (20, 35 e 50%) na concentração de 2% (m/v) foi adicionada em 150 μL da solução aquosa de CEQ (CEQ-A e CEQ-B) na concentração de 2% (m/v), perfazendo assim 300 μL de solução total. Em seguida foram misturados com o auxílio de uma barra magnética (diâmetro 3,3 mm, comprimento 10 mm) com uma velocidade de 100 rpm. Os experimentos foram realizados a 37 °C. O tempo de gelificação foi considerado com o tempo necessário para a mistura formar um glóbulo (Figura 11). Os resultados são uma média de 3 determinações.

Figura 11 - Mudança no aspecto físico da solução de GCOx 50 – CEQ B observada durante o ensaio de tempo de gelificação (a) $T=0$ e (b) $T=T_{\text{gel}}$.



Fonte: próprio autor.

Para acompanhar o tempo de gelificação por reologia, utilizou-se o reômetro AR 550 da TA Instrument e a mesma geometria descrita no item 3.8.1. Todos os hidrogéis formulados foram preparados em solução aquosa, na concentração de 2% (m/v) e razão 1:1 (v/v). Esses experimentos consistiram no acompanhamento da variação do módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') em função do tempo, onde t_{gel} é correspondente ao cruzamento entre eles, ponto no qual houve a transição sol-gel (*crossover*), a uma frequência de 1 Hz e tensão de cisalhamento de 5 Pa. As amostras líquidas foram transferidas para o reômetro e as medições iniciaram em $t = 140-150$ s após a mistura das soluções.

3.8.3 Microscopia eletrônica de varredura – MEV

A morfologia interna dos géis de GCOx-CEQ foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um microscópio de emissão Quanta-FEG FEI 450. Os hidrogéis liofilizados foram fraturados manualmente para expor sua região interna, em seguida colocados em suporte de alumínio (stub), fixados com fita de dupla-face de carbono e recobertos por deposição de íons metálicos de ouro. O diâmetro médio de poros dos *scaffolds* em diferentes graus de oxidação foi estimado utilizando 35 medidas de diâmetros de poros provenientes da imagem obtida pelo MEV. Os valores destas medidas foram coletados com o uso do programa ImageJ.

3.8.4 Porosidade

A porosidade foi calculada pelo método de infiltração do etanol (SARKER *et al.*, 2016). O etanol absoluto foi escolhido como o líquido de deslocamento, uma vez que se infiltra facilmente através dos poros dos suportes porosos sem causar qualquer dilatação ou efeito de encolhimento da sua estrutura. Os suportes porosos secos foram imersos em etanol absoluto e centrifugados por 10 min a 1200 rpm para facilitar a penetração do etanol em toda a amostra, pois os suportes porosos flutuam em etanol absoluto. Após a centrifugação, o excesso de etanol da superfície foi absorvido com o auxílio de um papel de filtro e o peso das amostras foi registrado. Os suportes porosos foram mantidos em etanol e sua massa foi determinada em intervalos regulares até que a massa se tornasse constante. Neste ponto, admite-se

que os poros se tornaram saturados com etanol. A porosidade dos corpos de prova foi calculada a partir da Equação 5.

$$\text{Porosidade (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{dV} \times 100 \quad (5)$$

onde W_1 e W_2 são os pesos dos suportes porosos antes e depois da imersão em etanol absoluto, respectivamente; d é a densidade do etanol absoluto a temperatura ambiente de 25 °C e V é o volume dos suportes porosos que foram obtidos a partir dos dados de comprimento, largura e altura medidos com o auxílio de um paquímetro digital de 0 a 150 mm – Digital caliper marca COSA. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.8.5 Ensaios de intumescimento

Foram realizados ensaios de intumescimento dos suportes porosos em solução tampão fosfato pH 7,4 à temperatura ambiente. Os géis secos (M_s) e pesados foram imersos em solução tampão pH 7,4. O ensaio teve duração de duas horas e retirou-se os corpos de provas em intervalos de 10 min, as superfícies dos géis intumescidos foram secas com papel filtro e a sua massa medida (M_u). O intumescimento foi obtido pela Equação 6, o ensaio foi realizado em triplicata.

$$\text{Intumescimento} = \frac{M_u - M_s}{M_s} \quad (6)$$

3.8.6 Teste de Degradação *in vitro*

A degradação dos *scaffolds* foi avaliada segundo metodologia descrita por Balakrishnan *et al.* (2017). Cada amostra de hidrogel seco por liofilização foi pesada e colocada em PBS (pH 7,4) para atingir o intumescimento máximo (24 h). Os *scaffolds* intumescidos foram colocados em 20 mL de PBS (pH 7,4; T = 37°C) e uma agitação constante de 100 rpm. As amostras foram removidas da solução em intervalos específicos de tempo (0,3,7,14, 21, 28 dias) e lavadas com água destilada. As amostras lavadas foram secas usando liofilização e a perda de massa da amostra

foi monitorada ao longo do tempo com base na massa inicial das amostras. A porcentagem de degradação foi calculada usando a Equação 7:

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{\text{Massa Inicial seco} - \text{Massa seca após degradação}}{\text{Massa inicial seco}} \times 100 \quad (7)$$

3.8.7 Análise das propriedades mecânicas dos scaffolds

Os *scaffolds* (diâmetro = 17,5 mm, altura = 7,0 mm) foram previamente intumescidos em PBS durante 24 h e submetidos a ensaios de compressão mecânica uniaxial até 90% de deformação, utilizando máquina universal EMIC (modelo DL - 3000) à temperatura ambiente (25 °C). Para análise foi utilizada uma célula de carga de 50 N e uma velocidade de carregamento de 1 mm min⁻¹.

A curva de tensão-deformação, obtida por meio dos ensaios de compressão gerada durante a análise foi usada para calcular o módulo Young (módulo de compressão). Esse módulo mede a rigidez das amostras, através da seção linear inicial da curva, ou seja, na faixa de tensão de 0-20%. A tensão de compressão máxima (σ_{MAX}) pode ser o ponto no qual o *scaffolds* se rompeu completamente ou a tensão máxima foi atingida, uma vez que alguns não fraturaram até uma deformação de 90%.

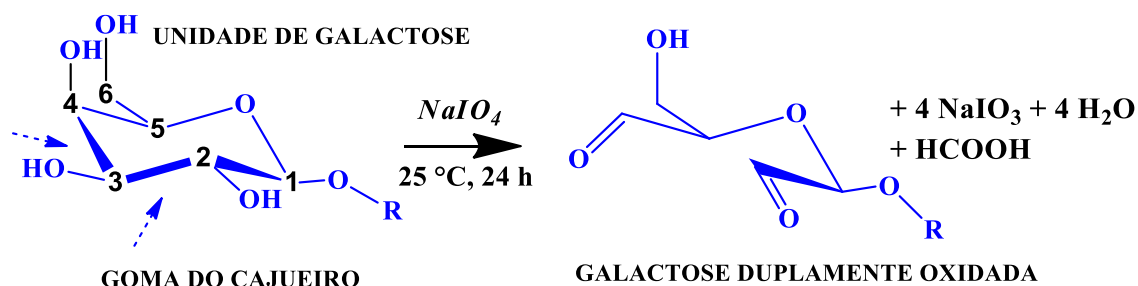
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da goma do cajueiro oxidada (GCOx)

4.1.1 Determinação do grau de oxidação por titulação potenciométrica

Foi utilizada a goma do cajueiro purificada seguindo o método de Rodrigues; Paula; Costa, 1993 em todas as análises. A reação da GC oxidada (GCOx) com NaIO_4 é mostrada na Figura 12. A presença dos grupos dialdeídicos foram confirmadas utilizando método de titulação potenciométrica com cloridrato de hidroxilamina.

Figura 12 - Reação de oxidação de uma unidade de galactose da cadeia lateral da goma do cajueiro.

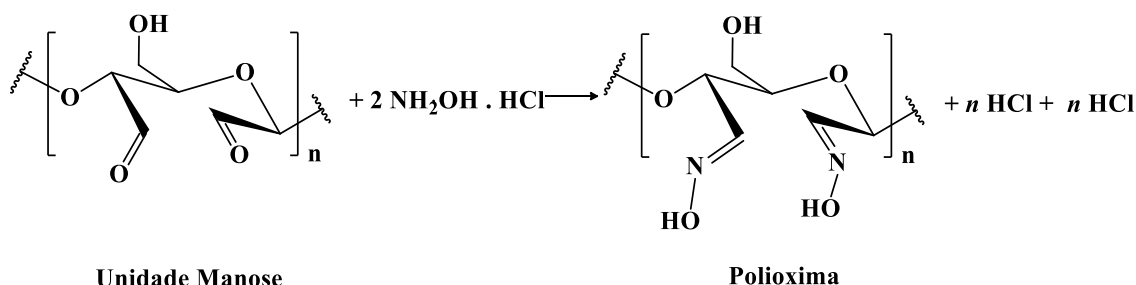


Fonte: próprio autor.

O grau de oxidação foi definido como a quantidade de unidades oxidadas por 100 unidades monossacarídicas. Como em cada unidade oxidada há a presença de dois grupos aldeídicos, são necessários dois mols de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, por isso que na Equação 4 a quantidade de material é dividida por dois.

Na Figura 13, foi observado a reação de uma unidade de manose oxidada com $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, formando como produto o derivado polioxímico ($\text{C}=\text{N}-\text{OH}$). Nessa reação há a ocorrência de um ataque nucleofílico proveniente do nitrogênio à carbonila da unidade oxidada, levando assim a formação de uma ligação $\text{N}=\text{C}$ com a liberação de HCl e água. O teor de grupos aldeídos em porcentagem foi calculado por titulação potenciométrica, através do HCl que foi liberado na reação com NaOH padronizado na concentração de $0,0989 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 13 - Representação da reação entre uma unidade de manose oxidada e $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$.



Fonte: próprio autor.

A Tabela 3 apresenta os valores dos graus de oxidação teóricos e reais para os derivados de GCOx, bem como os valores de volumes de NaOH (mL) que foram gastos para neutralizar o HCl liberado. Observa-se como esperado que quanto maior a quantidade adicionada de periodato de sódio, maior é o grau de oxidação dos derivados. Além disso percebe-se uma diferença entre os valores obtidos do grau de oxidação teórico e o grau de oxidação real. Isso pode ser explicado através da formação de hemiacetais que são estruturas geradas a partir da reação de um álcool e um grupo aldeído próximos.

Tabela 3 - Dados reacionais da goma do cajueiro com periodato de sódio a temperatura ambiente.

Amostra^c	Volume de NaOH (mL)^d	Grau de Oxidação^e	Rendimento final da reação (% em massa)^f
GCOx 20	1,91	15,2 ± 0,02	85 ± 1,4
GCOx 35	3,64	29,2 ± 0,48	82 ± 1,2
GCOx 50	5,21	41,3 ± 0,31	79 ± 1,1

^c A nomenclatura 20, 35 e 50 indica a % teórica em mol de NaIO_4 adicionado a unidade monossacarídea.

^d Volume de NaOH gastos para neutralizar o HCl liberado.

^e % mol definido como (a quantidade de aldeído determinado pelo cloridrato de hidroxilamina permitindo reagir com hidroxilamina/ 2 x unidades monossacarídeas) x 100.

^f Rendimento final em % em massa da reação, feito em triplicata.

Fonte: próprio autor.

Os hemiacetais envolvem grupos hidroxílicos em sua formação. No caso da goma do cajueiro oxidada com periodato, estes grupos são OH que não foram convertidos pelo periodato e são, de certo modo, involuntariamente protegidos de um novo ataque do íon periodato. Quanto maior o número de grupos aldeídicos, maior a

quantidade de hemiacetais formados, e por consequência quanto maior o grau de oxidação, maior será a diferença entre os valores teóricos e reais.

Os valores de rendimento final da reação de oxidação foram entre 85 e 79%, o que está de acordo com os valores encontrados para oxidação de polissacarídeos com periodato de sódio na literatura: Xilana (80%) (AMER *et al.*, 2016), goma arábica (80–85%) (SARIKA *et al.*, 2014) e alginato (90%) (BANIASADI *et al.*, 2016).

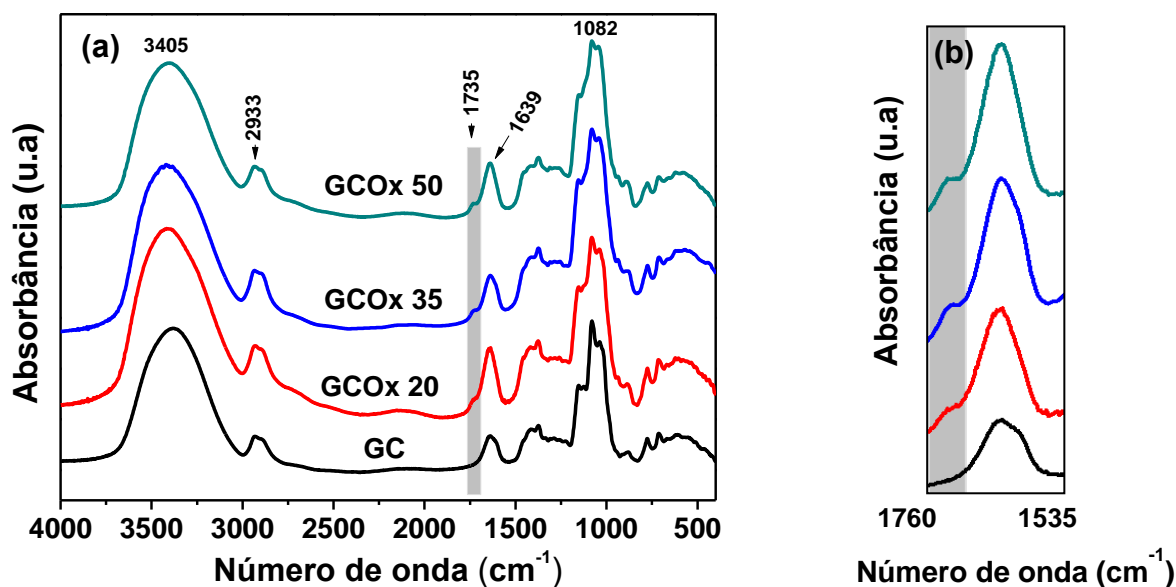
4.1.2 Espectroscopia de absorvância na região do infravermelho (FTIR)

A goma do cajueiro foi oxidada com NaIO_4 para dar origem ao derivado oxidado. A reação acontece via mecanismo de clivagem de ligação concertada de um éster iodato cíclico intermediário de 5 membros, que leva à formação dos grupamentos aldeído e a abertura do anel monossacarídeo (WANG *et al.*, 2013). Para a oxidação com periodato se processar é necessário que haja dióis vicinais na estrutura do polissacarídeo. Estes grupos (OH) devem estar orientados em uma posição equatorial-equatorial ou axial-equatorial para a reação poder ocorrer (KRISTIANSEN, POTTHAST E CHRISTENSEN, 2010), caso contrário a formação do intermediário éster iodato não ocorrerá e a reação não prosseguirá. A Figura 14, mostra o espectro de FTIR da goma do cajueiro e seus derivados oxidados. Os espectros apresentam bandas muito similares, como a banda em 3405 cm^{-1} que é referente ao estiramento vibracional do grupo O-H, em 2933 cm^{-1} (atribuída à vibração de estiramento simétrico e assimétrico de C-H), em 1639 cm^{-1} que está associada com a presença de água (KOUTSIANITIS *et al.*, 2015). Observa-se em 1366 cm^{-1} (estiramento O-H) e $1200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ (vibrações de estiramento C-O e C-C do hexapiranosil). As bandas em 1150 , 1082 e 1045 cm^{-1} são referentes ao estiramento de C-O-C e deformações dos grupos O-H das unidades glicosídicas (SILVA *et al.*, 2010).

Nos espectros dos derivados oxidados GCOx 20, GCOx 35 e GCOx 50 além das bandas que são características da goma do cajueiro, é observada uma banda de estiramento de fraca intensidade em 1735 cm^{-1} como destacado na Figura 14b, que é atribuída à ligação C=O dos grupos carbonílicos de aldeídos nas unidades oxidadas, o que evidencia a oxidação do polissacarídeo (KIM *et al.*, 2017; LEITE *et*

al., 2017). A fraca intensidade desta banda é atribuída na literatura à formação de estruturas hemiacetálicas intra- e intermoleculares que são formadas por ataque nucleofílico ao grupo carbonila.

Figura 14 – Espectro de FTIR da GC não modificada e os derivados oxidados (a) e região ampliada entre 1760 a 1535 cm^{-1} do espectro (b).

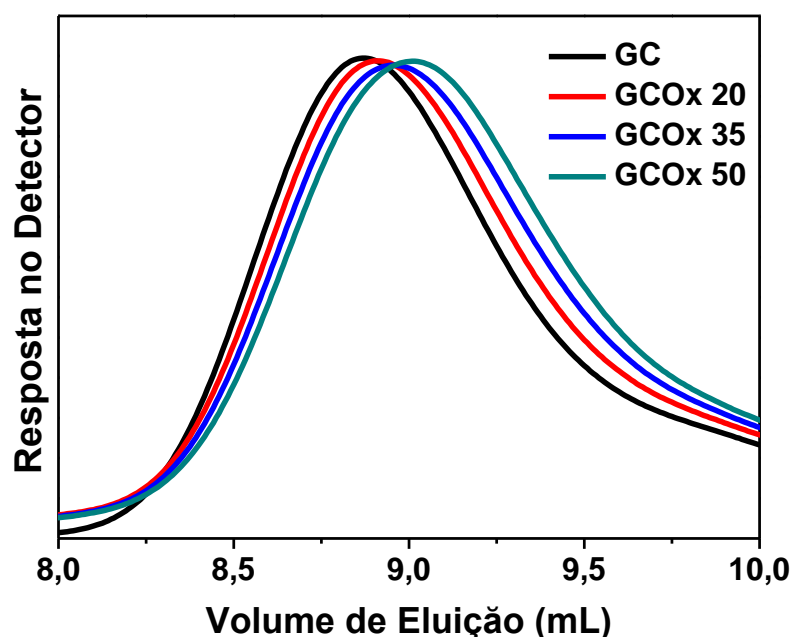


Fonte: próprio autor.

4.1.3 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A Figura 15 mostra o cromatograma de permeação em gel para a goma do cajueiro e seus derivados dialdeídicos.

Figura 14 - Cromatograma de GPC para as amostras de goma do cajueiro (GC) e seus derivados (GCOx).



Fonte: próprio autor.

Os valores de M_{pk} , que são mostrados na Tabela 4, foram obtidos através da Equação 8 que relaciona o volume de eluição com a massa molar de pico estimada, utilizando a curva de calibração com padrões de pululana.

$$\text{Log } M_{pk}: 14,6827 - 1,06967 V_e \quad (R= 0,987) \quad (8)$$

Tabela 4 - Comparação dos valores da massa molar da GC e seus derivados oxidados (GCOx).

Amostra	V_e (mL)	$M_{pk} \times 10^{-5}(\text{g/mol})$
GC	8,87	1,58
GCOx 20	8,91	1,43
GCOx 35	8,95	1,28
GCOx 50	9,01	1,12

Fonte: próprio autor.

Os resultados da massa molar de pico obtidos por GPC mostraram um pequeno aumento nos volumes de eluição com o aumento do grau de oxidação dos derivados da goma do cajueiro, registrando assim, uma diminuição da massa molar

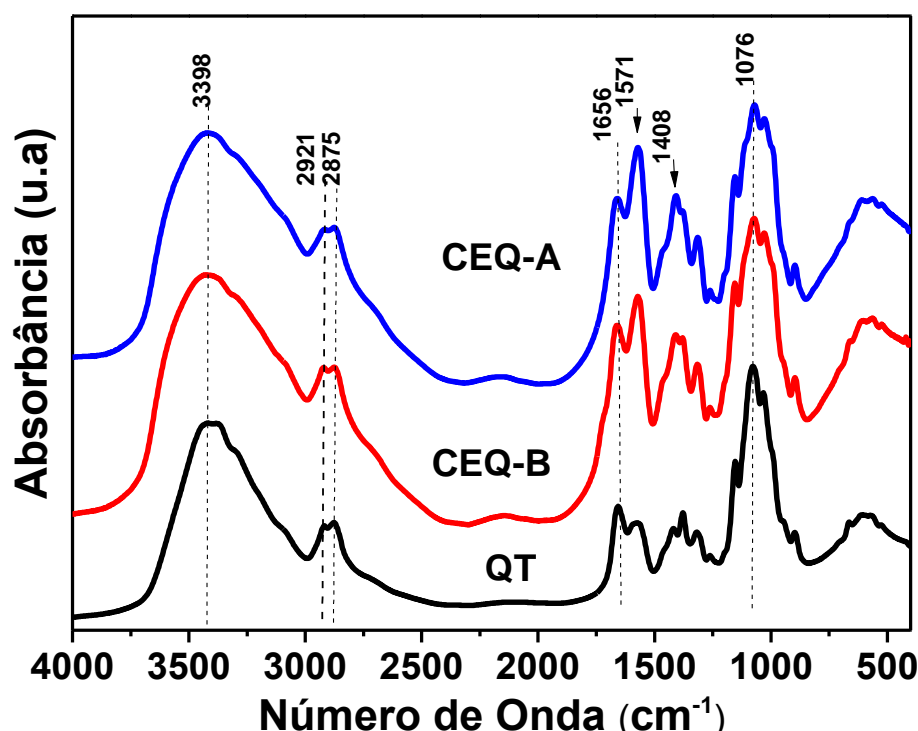
de pico (M_{pk}), como mostrado na Tabela 4. Esse fato é atribuído a uma maior clivagem das cadeias poliméricas (devido à quebra das ligações glicosídicas das cadeias laterais do polissacarídeo), causadas pela reação de oxidação que depende diretamente das quantidades estequiométricas utilizadas de periodato de sódio em solução. Resultados semelhantes foram observados para o alginato de sódio oxidado (DING *et al.*, 2017) e para dextrana oxidada (CABRAL *et al.*, 2014).

4.2 Caracterização da carboxietil quitosana (CEQ)

4.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

A Figura 16 mostra os espectros da quitosana e de seus derivados em diferentes graus de substituição.

Figura 15 - FTIR da Quitosana (QT) e Carboxietil Quitosana (CEQ A e CEQ B) em pastilhas de KBr.



Fonte: próprio autor.

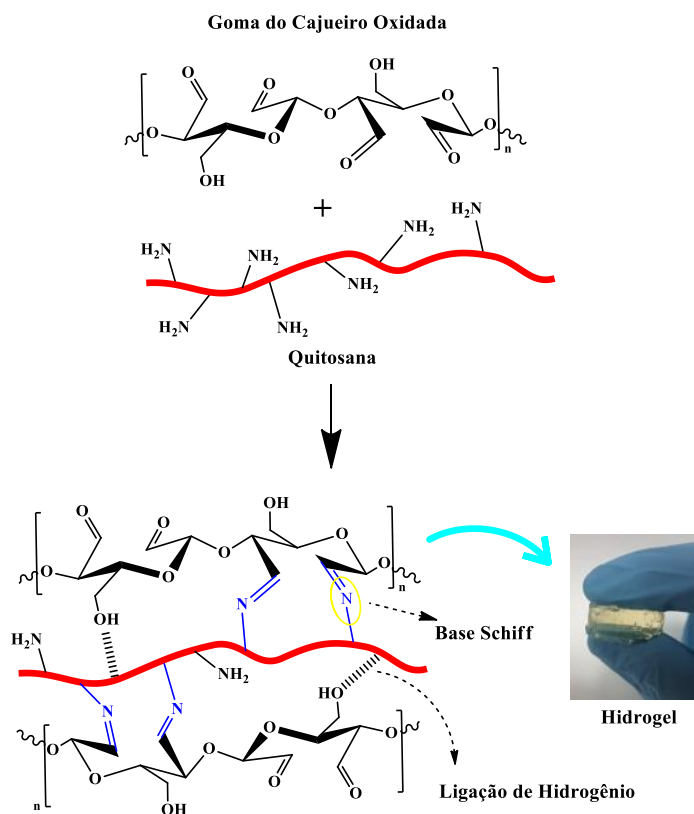
Os espectros apresentam bandas muito similares como em 3000 - 3690 cm^{-1} tendo uma intensidade máxima em 3398 cm^{-1} que é atribuída às vibrações de estiramento axial das ligações OH e com uma sobreposição à banda de estiramento

da ligação N-H. As bandas em 2921 cm^{-1} e 2875 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramento simétrico e assimétrico das ligações de C-H e ligações de hidrogênio, respectivamente (XU, AOTEGEN E ZHONG, 2017). Essas bandas são características de polissacarídeos e são encontradas em outros espectros de outros polímeros como xilana (MELO-SILVEIRA *et al.*, 2012), carragenana (EL- AASSAR *et al.*, 2015) e alginato (YAN *et al.*, 2017). A presença de grupos residuais N-acetil foi confirmada pelas bandas em 1656 cm^{-1} (C=O estiramento da amida I) e 1321 cm^{-1} (C-N estiramento da amida III), respectivamente. Não foi observada a pequena banda em 1550 cm^{-1} que corresponde à N-H da amida II, sendo sobreposta por outras bandas (LIM e HUDSON, 2004). A deformação simétrica das ligações de C-H em grupos metilênicos (CH_2) e metílicos (CH_3) foi confirmada pela presença das bandas em 1424 e 1370 cm^{-1} , respectivamente. A banda de absorção em 1148 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico da ligação C-O-C. As bandas em 1076 e 1032 cm^{-1} correspondem ao estiramento de C-O. Comparando os espectros dos derivados, observa-se o aparecimento de dois novos picos em 1571 e 1408 cm^{-1} no espectro da CEQ A e CEQ B, que é atribuído ao estiramento assimétrico e simétrico do grupo $-\text{COO}^-$ (HUANG *et al.*, 2016; QU *et al.*, 2017), indicando assim a introdução do grupo carboxilato no polissacarídeo.

4.3 Preparação e caracterização dos géis de GCOx-CEQ

A goma do cajueiro apresenta em sua estrutura hidroxilas vicinais que podem ser facilmente modificadas através da reação com periodato de sódio para formar grupos aldeídicos. Esses grupos servem como um bom reticulador macromolecular para polissacarídeos que contenha em sua cadeia grupos amino livres, como é o caso da quitosana. O processo de reticulação acontece principalmente devido à formação de base de *Schiff* e formação de hemiacetal intercadeia, no entanto interações secundárias como ligações de hidrogênio entre a CEQ e/ou GCOx também podem estar envolvidas durante a formação do hidrogel. A Figura 17 mostra uma representação esquemática das etapas envolvidas na síntese de formação do hidrogel.

Figura 16 - Reação entre GCOx e CEQ para formação da Base de Schiff.



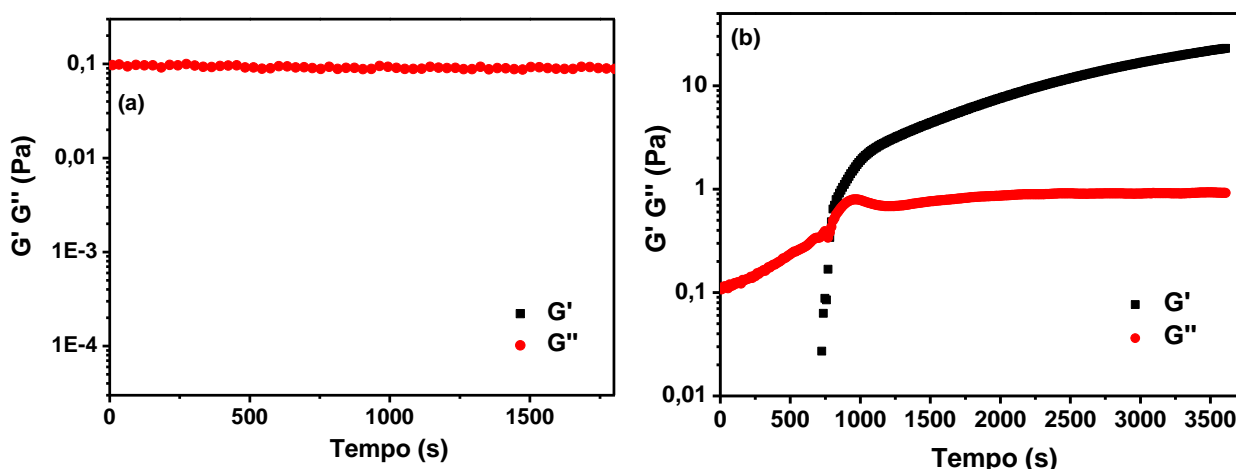
Fonte: próprio autor.

4.3.1 Ensaios reológicos

4.3.1.1 Tempo de gelificação

Com a finalidade de investigar a influência do grau de oxidação da GC na formação dos géis, foi realizado um ensaio reológico com GC não oxidada com a CEQ A e outro ensaio com GCOx 20 – CEQ A. A Figura 18 apresenta a evolução dos módulos de G' e G'' com o tempo.

Figura 17 - Evolução dos módulos G' e G'' com o tempo para: (a) GC-CEQ-A e (b) GCOx 20 – CEQ A na concentração de 2% (m/v) e razão de 1:1 (v/v).



Fonte: próprio autor.

Observa-se que para a GC não oxidada os valores do módulo de perda G'' são superiores ao módulo de armazenamento G' durante todo o intervalo de tempo estudado. Isto é, a solução não se caracteriza como um gel, mas com características de um líquido viscoso. Comparando com a formulação de GCOx, observa-se que G' possui valores maiores que o G'' ao final de $t=3600$ s indicando a formação de um gel com *crossover* definido em $t=775$ s. Assim conclui-se que a diferença entre as duas formulações pode ser explicada pela reação dos grupos aldeídicos presentes na GCOx-20 e os grupos amino da CEQ, formando a Base de *Schiff*. Na GC não modificada não há grupos aldeídicos em sua estrutura e por isso não houve a reação de reticulação dos polissacarídeos. Magalhães, 2013, trabalhando com suportes porosos (*scaffolds*) à base de gelatina e goma do cajueiro oxidada para engenharia de tecidos, observou comportamento semelhante, quando se utilizou a GC não modificada para o estudo da influência da reação de oxidação.

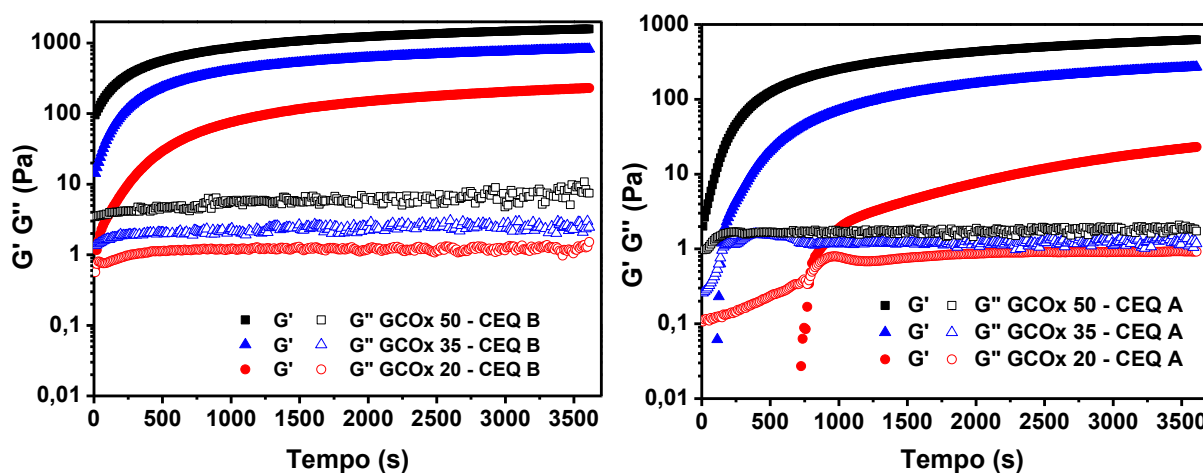
É muito importante conhecer o tempo de gelificação (t_{gel}), pois esse valor irá expressar o início da formação dos géis. O t_{gel} é importante para a aplicação como hidrogéis injetáveis, pois uma reticulação rápida pode provocar a formação do gel antes mesmo de sua injeção, ao mesmo tempo que uma gelificação lenta ocasionaria uma disseminação dos percusores do hidrogel para longe do local de injeção (LÜ *et al.*, 2015). E além disso, garante que na preparação dos *scaffolds* pré-formados a reação estará completa quando os géis forem submetidos ao processo de congelamento e liofilização.

Existem diferentes métodos de se determinar o tempo de gelificação t_{gel} , sendo um dos mais comuns, o método de inversão de tubo, que consiste em uma análise visual. Inverte-se o tubo em intervalos regulares de tempo a uma temperatura constante, em banho termostático até nenhuma fluidez ser observada (PONTREMOLI *et al.*, 2018). Outro método bastante conhecido é o da barra magnética, com formação de glóbulo (DORRAJ; MOGHIMI, 2015), além do acompanhamento por análise em reômetro (DOMINGUES *et al.*, 2015).

Neste trabalho, o t_{gel} foi determinado por comparação entre dois métodos, utilizando reômetro, no qual analisou-se os módulos G' e G'' durante o processo de gelificação, e visualmente, pelo método da barra magnética.

A Figura 19 mostra a evolução do G' (módulo de armazenamento) e G'' (módulo de perda) com o tempo para os diferentes sistemas de polissacarídeos GCOx-CEQ com o intuito de avaliar o *crossover* $t_{(gel)}$.

Figura 18 - Evolução do módulo de armazenamento (G') e de perda (G'') com o tempo para GCOx-CEQ 2% (m/v) na razão 1:1 a 37 °C. O tempo de cruzamento G' e G'' é denominado como *crossover* t_{gel} (ponto de gelificação).



Fonte: próprio autor.

Na Figura 19 é observado que alguns sistemas apresentam a transição de sol-gel, mas não é possível a sua detecção pelo método utilizado, pois o *crossover* ocorre rapidamente, como é o caso das formulações GCOx 35 – CEQ B e GCOx 50 – CEQ B mostrando valores de G' superiores ao G'' no início das análises, indicando que o tempo de gelificação ocorreu antes mesmo de se inicializar a análise no reômetro. Para as demais formulações foi observado que no início os sistemas se comportaram

como um fluido viscoso (sol), pois G'' foi maior que G' . Com o passar do tempo os valores de G' e G'' aumentam moderadamente, evidenciando assim a ocorrência da reticulação química através da formação da Base de Schiff. Contudo, o módulo de armazenamento G' teve um aumento progressivo e mais rápido que o módulo de perda G'' , notando assim o ponto de gelificação (*crossover*). Depois de aproximadamente 1000s as formulações alcançaram um platô, indicando que o processo de reticulação foi concluído.

A Tabela 5 mostra os valores de t_{gel} obtidos com reômetro e pelo método da barra magnética.

Tabela 5 - Tempo de gelificação para os hidrogéis (concentração de 2% (m/v) e temperatura de 37 °C) formulados a partir de GCOx e CEQ.

Amostras	CEQ – A			CEQ- B		
	^g t_{gel} (min)	^h t_{gel} (min)	ⁱ G' (Pa)	^g t_{gel} (min)	^h t_{gel} (min)	ⁱ G' (Pa)
GCOx - 50	2,36 ± 0,09	2,68	627	1,00 ± 0,04	-	1583
GCOx - 35	4,77 ± 0,09	4,89	272	1,52 ± 0,13	-	823
GCOx - 20	14,89 ± 0,22	15,58	23	3,54 ± 0,04	2,98	230

^g t_{gel} determinado pelo método da barra magnética

^h t_{gel} determinado reologicamente

ⁱ Valores referentes ao módulo de armazenamento G'

Fonte: próprio autor.

Comparando os dois métodos, foram observados valores aproximados e que os tempos de gelificação obtidos por reologia foram superiores aos obtidos pelo método da barra magnética, indicando assim que o método no reômetro é mais preciso comparado com o método visual da barra magnética. Os valores nos dois métodos mostram a influência do grau de oxidação nas formulações, pois o aumento do grau de oxidação de 20% a 50% reduziu consideravelmente os valores de t_{gel} de 15,58 para 2,68 minutos, indicando que uma maior quantidade de grupamentos aldeídicos proveniente da goma do cajueiro oxidada influencia diretamente no aumento da reticulação e por consequência na redução dos valores de t_{gel} .

Os valores de t_{gel} ocorrerem em sua maioria entre 1 a 5 min, mostrando que todas as formulações podem ter aplicações biomédicas como suportes porosos e também como hidrogéis injetáveis. (FATHI *et al.*, 2014).

Foi observado que o grau de substituição da CEQ também tem sua influência nos valores de t_{gel} e G' . Na Tabela 5, verifica-se que as formulações com CEQ-A apresentam t_{gel} maiores e valores de G' menores que as formulações CEQ-B, pois o sistema CEQ-B apresenta um menor grau de substituição da quitosana comparado com CEQ-A, fazendo com que haja um maior número de grupamentos amino livres para reagir com os grupamentos aldeídicos da GCOx, resultando assim em um maior grau de reticulação dos hidrogéis e por consequência um menor t_{gel} .

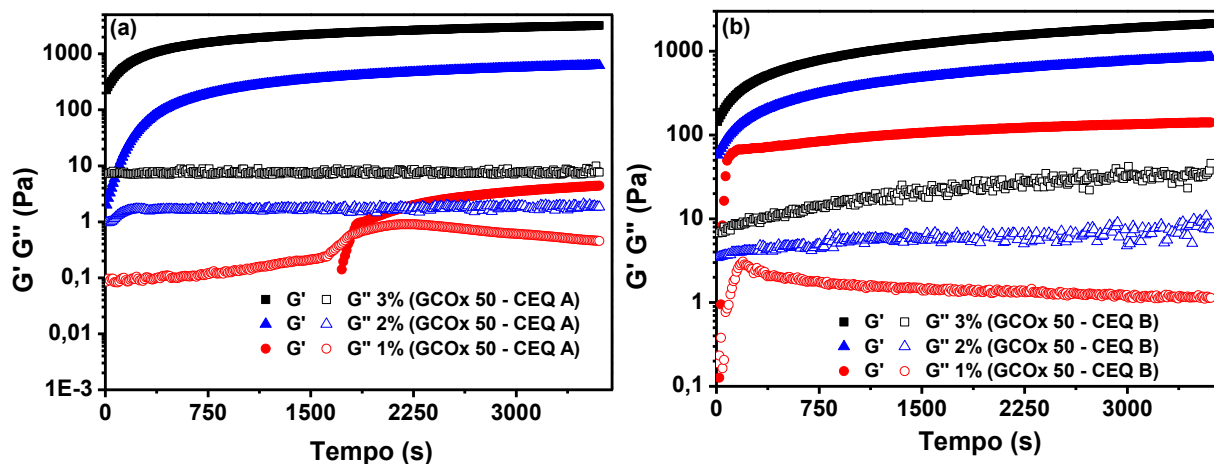
4.3.1.2 Efeito da concentração dos polímeros

Com o intuito de analisar a influência da concentração dos polímeros na formação dos géis e eventual escolha das condições para utilização no trabalho e determinar a concentração ótima de formação dos géis, foram realizados ensaios reológicos com diferentes concentrações de GCOx/CEQ (3%, 2%, e 1%) para ambos os polissacarídeos modificados na razão de 1:1 (v:v), com todas as suas diferentes composições e na temperatura de 37° C.

A Figura 20 mostra a evolução do G' (módulo de armazenamento) e G'' (módulo de perda) com o tempo para as diferentes concentrações das misturas de polissacarídeos (GCOx50/CEQ A e GCOx50/CEQ B).

Os gráficos que apresentam a variação de G' e G'' com o tempo, para a formação dos géis em diferentes concentrações a partir da goma do cajueiro oxidada nos graus de oxidação de 20, 35 em comparação com 50, são apresentados no Apêndice A.

Figura 19 - Módulos G' e G'' em função do tempo durante a gelificação dos sistemas GCOx 50 – CEQ A (a) e GCOx 50 – CEQ B (b) em diferentes concentrações.



Fonte: próprio autor.

A partir dos gráficos apresentados observa-se uma relação entre os módulos de G' e G'' com a concentração dos polissacarídeos. Os valores de G' e G'' aumentam à medida que a concentração dos polímeros aumenta de 1% a 3% (m/v), como observado também, para as amostras obtidas com GCOx20 e GCOx35 (Apêndice A). Isso indica que um aumento da concentração da GCOx-CEQ eleva a probabilidade de choque entre os grupos aldeídos da GCOx e os grupos amino livres da CEQ, aumentando as chances de haver a formação de mais pontos de reticulação pela formação da Base de *Schiff*, levando à formação de géis mais firmes.

Para soluções de 1% (m/v), os valores de G' iniciaram consideravelmente menores que o G'' , mas com o tempo os valores de G' aumentam a uma taxa moderada, sugerindo assim formação mais lenta dos pontos de reticulação entre a GCOx e a CEQ. No entanto, pode-se notar que os valores de G' são relativamente baixos indicando que os géis apresentam em sua estrutura uma baixa reticulação e por consequência são tidos como hidrogéis fracos.

Para soluções de 2% e 3% (m/v) os valores iniciais de G' excedem consideravelmente o valor de G'' atribuindo-se à formação de redes elásticas tridimensionais, sugerindo-se que os hidrogéis encontram-se mais reticulados.

A concentração de 3% (m/v) dos polímeros apresentou os maiores valores de G' , no entanto, os polissacarídeos CEQ-A ou CEQ-B nessa concentração apresentam uma alta viscosidade, dificultando sua dissolução e pipetagem. Por esse

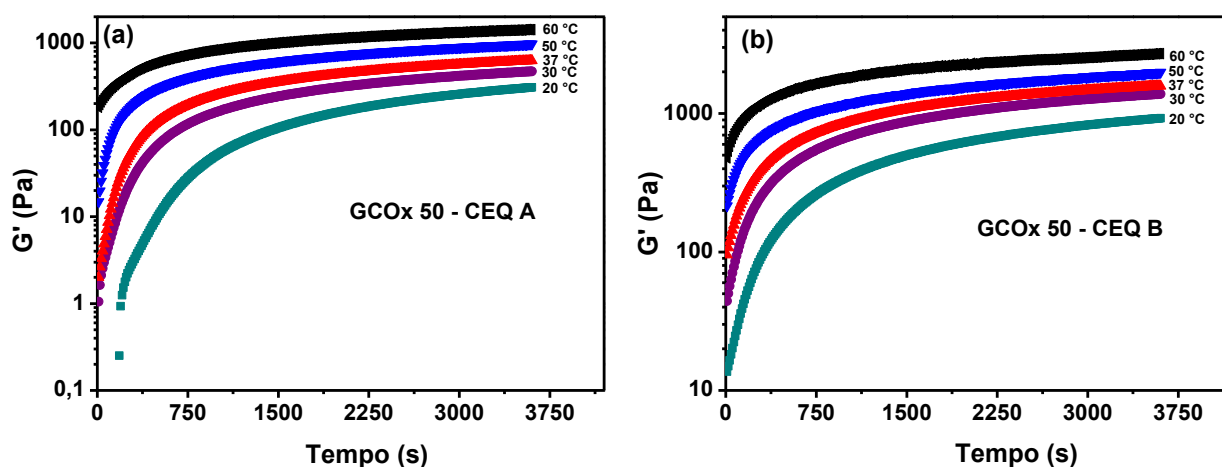
motivo optou-se em utilizar a concentração de 2% (m/v) na qual os géis apresentaram elevado valor de G' , boa solubilidade e fluidez.

4.3.1.3 Efeito da temperatura

A Figura 21 mostra o efeito da temperatura na gelificação em função do tempo das formulações GCOx 50 – CEQ A e GCOx 50 – CEQ B (concentração 2% (m/v), razão 1:1 (v/v)) em diferentes temperaturas variando de 20-60 °C.

Os gráficos que apresentam a variação do módulo G' com o tempo durante o processo de gelificação em diferentes temperaturas, para a formação dos géis a partir da goma do cajueiro oxidada nos graus de oxidação de 20, 35 em comparação com 50, são apresentados no Apêndice B.

Figura 21 – Dependência do módulo elástico G' com o tempo durante o processo de gelificação da GCOx 50 – CEQ A (a) e GCOx 50 – CEQ B (b) em diferentes temperaturas.



Fonte: próprio autor.

Como ilustrado, é observado que o tempo necessário para ocorrer a gelificação dos sistemas é dependente da temperatura. O rápido aumento de G' pode estar relacionado à velocidade de reticulação entre os grupos amino livres da quitosana e os grupos aldeídicos da GCOx, esses dois regimes atingem valores maiores à medida que a temperatura aumenta, ocasionado por uma maior aceleração molecular, aumentando assim as chances de haver interações inter e/ou intramolecular. Weng; Chen; Chen (2007) trabalhando com *Schizophyllan* oxidada e gelatina observaram comportamento semelhantes para diferentes temperaturas.

Para calcular a energia de ativação (E_a) envolvida durante o processo de gelificação de todas as formulações, foi utilizada a Equação de Arrhenius (WENG; CHEN; CHEN, 2007).

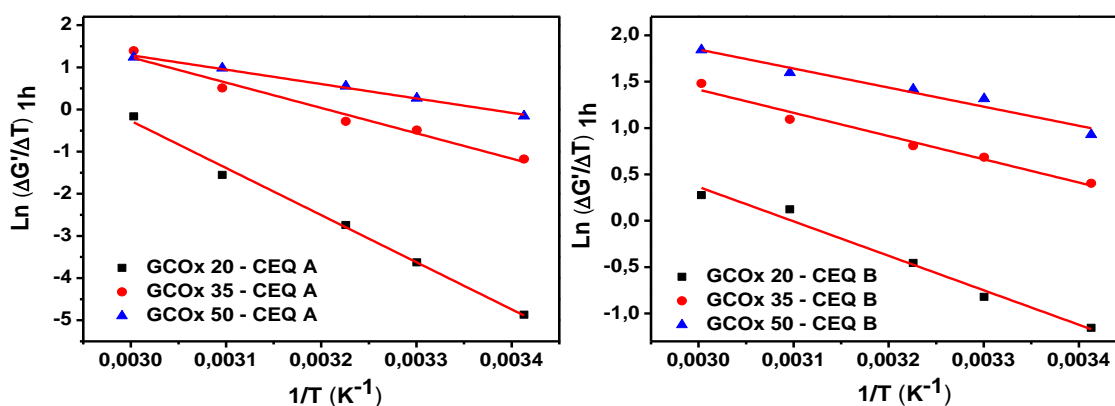
$$\ln (\Delta G' / \Delta t)_{1h} = k - \frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T} \quad (9)$$

Onde $(\Delta G' / \Delta t)$ é a taxa de gelificação no intervalo de tempo de 1h, T é a temperatura em Kelvin, R é a constante universal dos gases $8,314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ e k é uma constante.

A Figura 22 mostra o gráfico semi-log do tempo de gelificação em função do inverso da temperatura da GCOx-CEQ com diferentes graus de oxidação. Para todas as formulações, o coeficiente de linearidade foi em média 0,987. Além disso, os sistemas apresentaram diferentes valores de inclinação da reta, sugerindo que a E_a é dependente do grau de oxidação da GCOx e da substituição da CEQ. A taxa de gelificação da GCOx-CEQ a qualquer temperatura pode ser prevista com o auxílio da E_a .

Os valores de E_a obtidos para todas os sistemas são encontrados na Tabela 6, como observado, ao aumentar o grau de oxidação (GCOx) ou uma maior quantidade de grupamentos amino livres (Comparação entre CEQ A e CEQ B) das reações, mais colisões efetivas iram acontecer por ter uma maior quantidade desses grupos, levando a um aumento da reticulação tornando as reações mais favoráveis, pois quanto menor a E_a , menor será a “barreira” de energia necessária para a formação dos hidrogéis, e portanto uma reação mais rápida. Valores próximos foram encontrados por Fang; Takahashi; Nishinari, (2005), que ao trabalhar a partir de *Schizophllan* oxidada e Gelatina obtiveram valores de E_a igual a $100,4 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Figura 20 - Gráfico da taxa de gelificação ($\Delta G' / \Delta t$) contra o inverso da temperatura ($1/T$) do processo de gelificação dos sistemas GCOx-CEQ com diferentes graus de oxidação.



Fonte: próprio autor.

Tabela 6 - Valores de energia de ativação (E_a) para o processo de gelificação dos sistemas GCOx-CEQ com diferentes graus de oxidação.

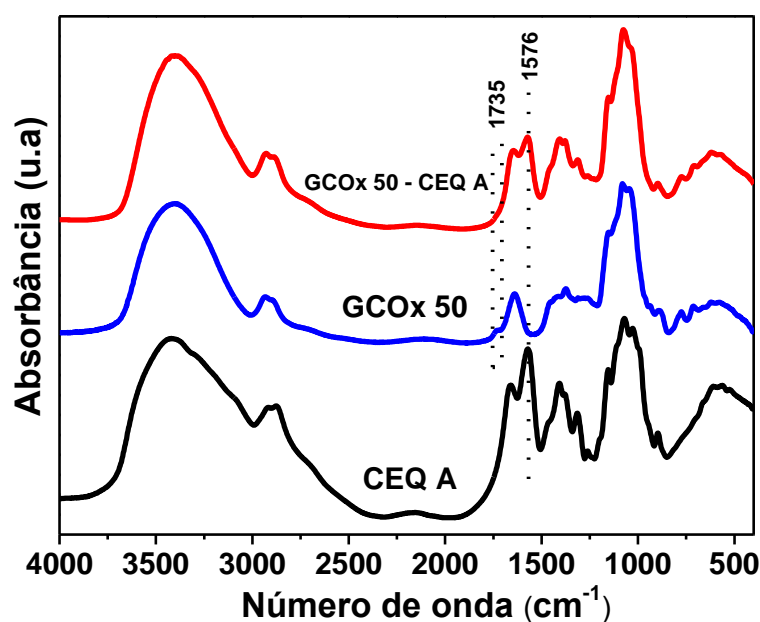
Amostras	E_a (kJ mol ⁻¹)	
	CEQ – A	CEQ- B
GCOx – 50	28,4	17,1
GCOx – 35	49,9	20,8
GCOx – 20	92,9	30,9

Fonte: próprio autor.

4.4 Espectroscopia de absorvância na região do Infravermelho (FTIR) dos géis de GCOx-CEQ

A Figura 23 apresenta os espectros da GCOx 50, CEQ A e dos géis formados a partir da GCOx 50 – CEQ A (Liofilizados).

Figura 21 - Espectro de infravermelho de CEQ A, GCOx 50 e do gel GCOx 50 – CEQ A.



Fonte: próprio autor.

Foram observadas bandas comuns dos materiais percussores desses hidrogéis, como as bandas em 3405 e 1080 cm⁻¹ atribuídas ao estiramento O-H e estiramento C-O-C de ligação glicosídica oriunda da goma do cajueiro oxidada, e dos grupos residuais N-acetil em 1656 cm⁻¹ (C=O estiramento da amida I) e 1321 cm⁻¹

(C-N estiramento da amida III) da quitosana. A reação da Base de *Schiff* entre os grupos aldeídos provenientes da GCOx e dos grupos amino da CEQ levam à formação da ligação imina (C=N) que apresenta uma banda característica em 1637 cm^{-1} . Contudo essa banda não foi observada no espectro, pois possivelmente foi sobreposta pela banda de amida I nessa região. No entanto, podem ser observadas algumas evidências da reação de base de *Schiff* (formação da ligação imina), como a diminuição da banda em 1576 cm^{-1} proveniente da CEQ A que é atribuído à banda N-H da amina primária, e o desaparecimento da banda de estiramento em 1735 cm^{-1} característica da ligação de aldeído (C=O) proveniente da GCOx 50, sugerindo que esses grupos foram utilizados para a reação de reticulação.

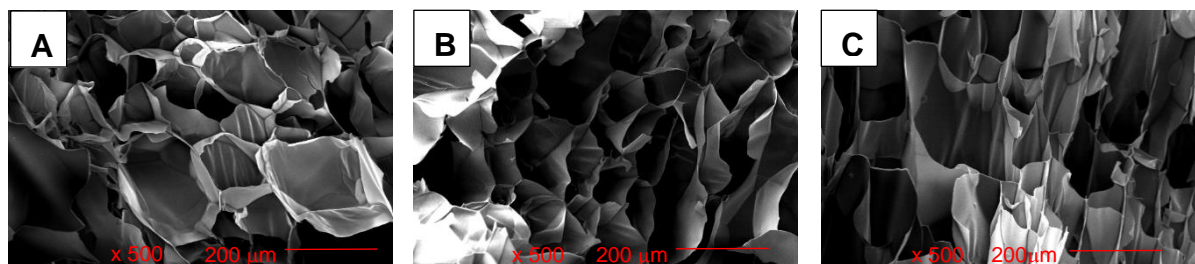
4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As morfologias dos suportes porosos a partir dos géis de GCOx-CEQ foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 24), com géis obtidos pelo método *freeze-drying* (congelamento seguido de secagem por liofilização), onde possibilita a origem de estruturas porosas com diâmetros, formas diferentes e uma distribuição homogênea.

A morfologia dos hidrogéis é um dos parâmetros mais importantes para a aplicação na engenharia de tecidos. Para ocorrer o crescimento tecidual, deverá existir uma rede porosa e interconectada, possibilitando uma adesão e uma proliferação celular, bem como a difusão e troca de nutrientes e oxigênio (YAN *et al.*, 2016).

As micrografias MEV da secção transversal dos géis de GCOx-CEQ B são mostradas na Figura 24 (a-c).

Figura 22 – Micrografias MEV da seção transversal dos géis de GCOx-CEQ em seus diferentes graus de oxidação: (A) GCOx20-CEQ B; (B) GCOx35 – CEQ B; (C) GCOx 50- CEQ B.



Fonte: próprio autor.

A rede porosa interna dos hidrogéis pode ser facilmente observada nas imagens, podendo-se notar também que a morfologia e a distribuição aleatória dos poros foram influenciadas pelo aumento do grau de oxidação da GC, o qual é uma vantagem do método utilizado nesse experimento (freeze-drying) (AGUA *et al.*, 2018). A partir das micrografias e da figura do tamanho médio dos poros apresentada no apêndice C, percebe-se que ao aumentar o grau de oxidação da GCOx provoca-se um aumento do tamanho médio dos poros. O gel de GCOx 20 – CEQ B, apresentou o menor tamanho médio de poros com valor de $63 \pm 6 \mu\text{m}$, possivelmente esse grau de oxidação não propiciou a formação de uma estrutura tridimensional estável. Esses dados estão de acordo com os experimentos reológicos, nos quais os géis com grau de oxidação de 20% apresentaram menores valores de G' . Isto indica a formação de géis mais fracos e conseqüentemente com poucos pontos de reticulação. Apenas a partir do grau de oxidação da GCOx 35, que obteve um gel com tamanho médio de $132 \pm 12 \mu\text{m}$, e GCOx 50 com média de $244 \pm 24 \mu\text{m}$, observou-se a formação de estruturas tridimensionais estáveis, com redes interconectadas. Os valores de tamanho de poros obtidos neste estudo estão na faixa recomendada para aplicações gerais de engenharia de tecidos que está entre 50 a 400 μm . (CUI *et al.*, 2014; FOSS *et al.*, 2013).

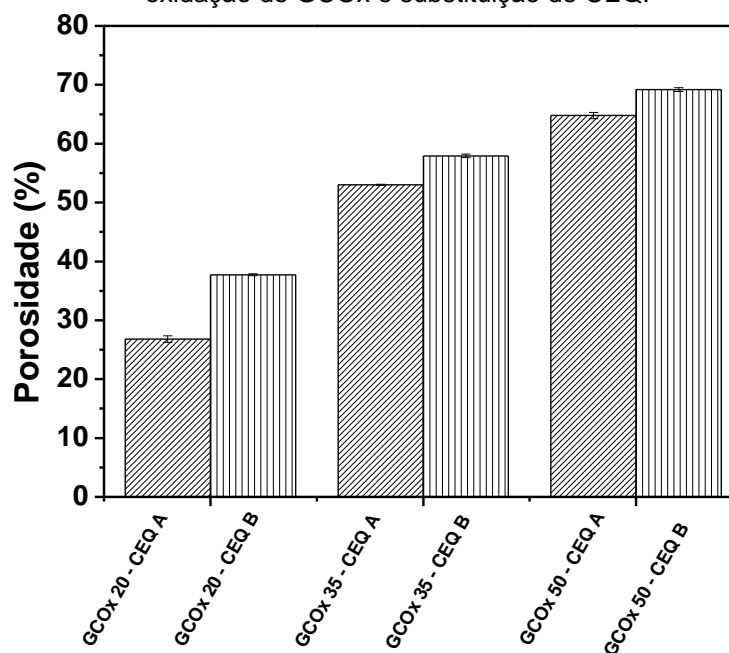
4.6 Porosidade

A porosidade, tamanho médio dos poros e sua rede interconectada estão entre as propriedades mais importantes dos *scaffolds* nas engenharia de tecidos, pois

essa propriedade permite a penetração, crescimento e proliferação celular, assim como a vascularização (PERSSON *et al.*, 2018; SARKER *et al.*, 2016).

A Figura 25 mostra a porosidade dos géis de GCOx – CEQ realizada pelo método de infiltração em etanol e calculada pela Equação 5.

Figura 23 - Valores de porosidade, dos géis de GCOx-CEQ em diferentes razões de graus de oxidação de GCOx e substituição de CEQ.



Fonte: próprio autor.

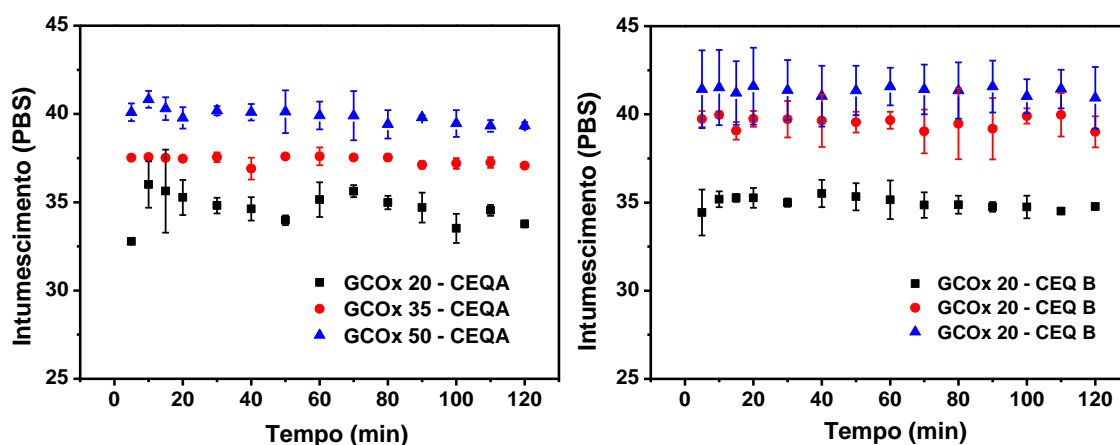
A porosidade dos *scaffolds* mostraram uma concordância com o resultado dos diâmetros médios dos poros obtidos por MEV. Pode-se observar que os géis de GCOx 20 - CEQ A e GCOx 20 - CEQ B apresentaram valores médios de porosidades de $26,8 \pm 0,57\%$ e $37,4 \pm 0,17\%$, seguidos por GCOx 35 – CEQ A e GCOx 35 – CEQ B ($53,0 \pm 0,09$ e $58,0 \pm 0,30$) e os géis de GCOx 50 – CEQ A e GCOx 50 – CEQ B obtiveram valores de porosidade de $64,8 \pm 0,52$ e $69,2 \pm 0,34$. A maior porosidade é encontrada nos *scaffolds* com maior grau de oxidação (GCOx 50-CEQ). Esses valores estão de acordo com estudos anteriores que relataram que *scaffolds* acima de 50% de porosidade são ideais para aplicações em engenharia de tecidos (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005; YOOK *et al.*, 2012).

4.7 Ensaio de Intumescimento

O intumescimento dos hidrogéis, ou seja, a capacidade de absorver água, é uma das mais importantes características dos biomateriais para engenharia de tecidos (NAIR *et al.*, 2015). A absorção de água leva a um aumento do diâmetro médio dos poros dos suportes porosos que influencia diretamente na absorção de fluidos corporais, no transporte de nutrientes celulares e na migração de moléculas bioativas através das redes interconectadas da sua estrutura 3D (VALENTE *et al.*, 2013).

A Figura 26 e a Tabela 7 apresentam o intumescimento dos géis de GCOx/CEQ em diferentes graus de oxidação e de substituição da CEQ.

Figura 24 - Intumescimento dos hidrogéis com duas horas em PBS pH 7,4 (concentração 2% (m/v) e razão 1:1 (v/v)).



Fonte: próprio autor.

A Tabela 7 exibe os valores médios de intumescimento com duas horas de imersão em PBS.

Tabela 7 - Intumescimento médio dos *scaffolds* em diferentes graus de oxidação da GCOx e substituição da CEQ em PBS à temperatura ambiente.

Hidrogel	Intumescimento (PBS)	
	CEQ A	CEQ B
GCO20	34,7 ± 0,9	35,0 ± 0,3
GCO35	37,4 ± 0,2	39,5 ± 0,3
GCO50	39,9 ± 0,4	41,3 ± 0,2

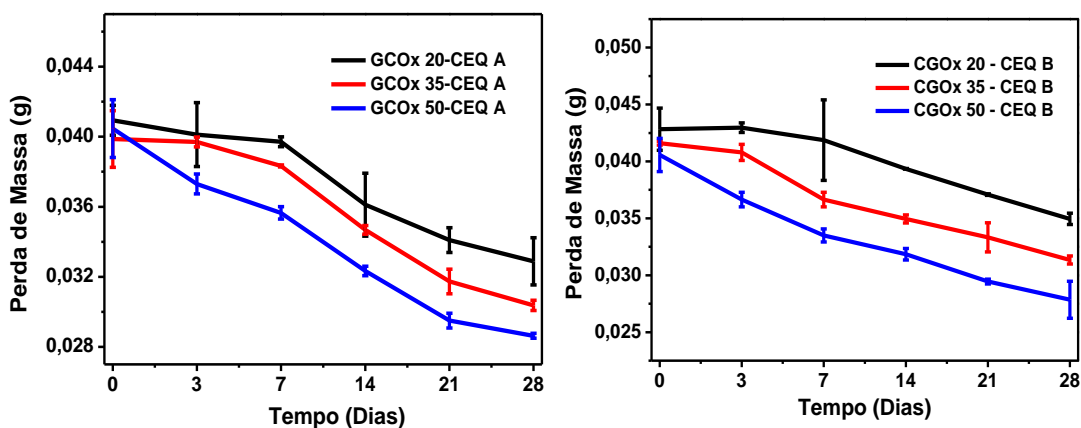
Fonte: próprio autor.

Pode-se notar que durante todo o período de duas horas os géis de GCOx/CEQ, nas diferentes condições, apresentaram valores de intumescimento praticamente constante. Esse perfil mostra-se importante, pois previne a perda de fluídos e de nutrientes corporais dentro do tempo do experimento, quando aplicado como suporte poroso. O resultado de intumescimento está de acordo com a análise de porosidade, os hidrogéis de GCOx50-CEQ A e GCOx50 – B foram os que mais intumesceram, logo é observado que ao aumentar o grau de oxidação o intumescimento médio aumenta, isso pode ser explicado pela estrutura entrelaçada dos hidrogéis. Assim, possivelmente um maior grau de oxidação da GC levará a um grande número de grupos aldeídos disponíveis para reagir com os grupos amina da carboxietil quitosana, proporcionando uma elevada quantidade de ligações cruzadas, podendo assim levar a uma maior capacidade de reter elevadas quantidades de água. Resultados semelhantes de intumescimento foram encontrados por CAI *et al.*, 2007, para compósitos de alginato de sódio oxidado com graus de oxidação 26,57 e 88%, gelatina e Bórax, em que neste estudo foi relatado que quanto maior o grau de oxidação maior intumescimento dos géis preparados com esses derivados.

4.8 Teste de degradação *in vitro*

A Figura 27 apresenta a degradação *in vitro* dos géis de GCOx/CEQ em diferentes graus de oxidação.

Figura 25 – Cinética de degradação *in vitro* das diferentes formulações dos géis de GCOx-CEQ em PBS (pH=7,4) à temperatura ambiente e 100 rpm.



Fonte: próprio autor.

A degradação *in vitro* nos diferentes graus de oxidação da GCOx e de substituição da QT foram conduzidas em PBS (pH = 7,4), com o intuito de examinar a perda de massa dos *scaffolds* a 37 °C e agitação de 100 rpm. Como mostrado na Figura 27, nenhum dos *scaffolds* sofreu perda de massa considerável nos primeiros 3 dias, seguida por uma degradação mais moderada ao longo do tempo estudado de 28 dias, confirmando assim que as diferentes formulações de CGOx-CEQ podem ser degradadas hidroliticamente.

Observou-se que a degradação está diretamente relacionada à quantidade de pontos de reticulação formados através das ligações iminas (Base de *Schiff*). Pois as formulações de CGOx 20-CEQ B apresentam um menor grau reticulação como mostrado nos ensaios reológicos, resultando assim em um perfil com uma menor perda de massa (aproximadamente 18,5%) entre as formulações estudadas. Nos *scaffolds* formulados por CGOx 50-CEQ B, que possuem uma maior reticulação, ocorre uma maior degradação, média de 31,4% em seu peso em massa. Em geral, o comportamento dos hidrogéis é altamente relacionado à quantidade de reticulação nos materiais (LEE; BOUHADIR; MOONEY, 2000).

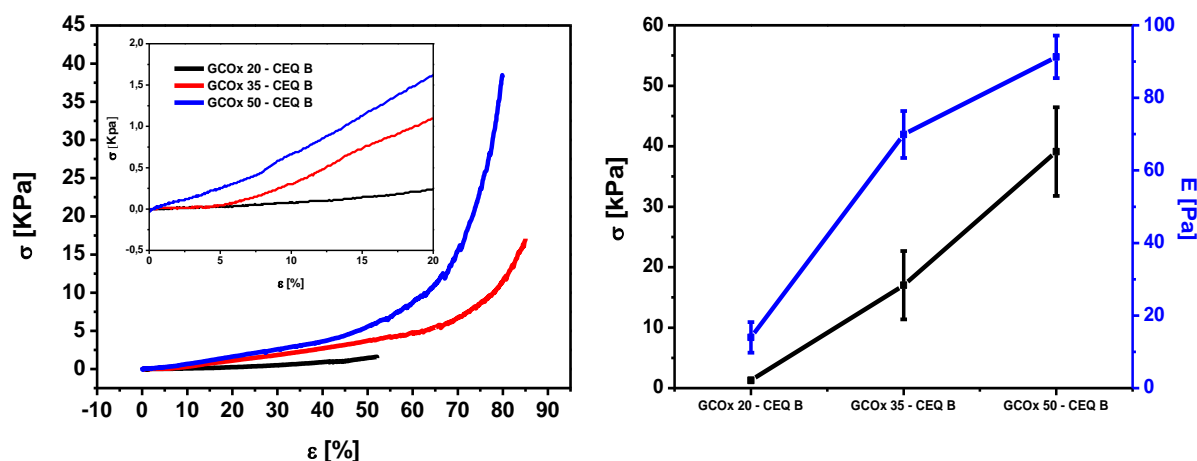
Neste estudo, observa-se que os *scaffolds* têm capacidade de manter a estrutura 3D em condições salinas. Assim, uma degradação a longo prazo permitirá a manutenção da estrutura do andaime durante o tempo necessário para permitir a regeneração do tecido lesionado, podendo ser utilizados para aplicações de cartilagem cuja regeneração é frequentemente lenta (HUTMACHER, 2006).

4.9 Análise das propriedades mecânicas dos *scaffolds*

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* nas aplicações de engenharia de tecidos são de grande importância devido a necessidade da estabilidade estrutural para suportar as tensões ocorridas durante a cultura *in vitro* e a implantação *in vivo* (MOREIRA-TEIXEIRA *et al.*, 2011). O teste compressivo é usado para estudar a relação entre tensão e deformação dos materiais sob a ação da pressão estática uniaxial.

A Figura 28 mostra as características da curva tensão-deformação dos hidrogéis de GCOx com três graus de oxidação de 20, 35 e 50% e CEQ B, realizadas com os hidrogéis liofilizados e intumescidos em PBS por 24h.

Figura 26 – Propriedades mecânicas dos *scaffolds*: (a) curva representativa de tensão-deformação compressiva dos *scaffolds* hidratados de GCOx 20 – CEQ B, GCOx 35 – CEQ B e GCOx 50 – CEQ B (A inserção do gráfico, representa uma ampliação da região (0-20% de tensão) usado para determinar o módulo de compressão. (b) Resumo da tensão máxima (σ_{max}) e o módulo de compressão (E)).



Fonte: próprio autor.

Como mostrado na Figura 28a, ambos os *scaffolds* de CGOx 35-CEQ B e CGOx 50-CEQ B não fraturaram após uma deformação de até 90%, recuperando quase completamente sua estrutura inicial após a descompressão. No entanto, a formulação de CGOx 20-CEQ B exibiu uma estrutura mais frágil, fraturando-se em um valor de tensão de aproximadamente 55%. O módulo de compressão, bem como a resistência à compressão de cada estrutura foram determinados a partir dos perfis da curva de tensão-deformação que exibiram relação linear até aproximadamente 20% e um comportamento não linear acima desse valor.

Os módulos de compressão dos *scaffolds* nos diferentes graus de oxidação (20,35 e 50%, sobre 0-20% de tensão) foram de $13,9 \pm 4,2$ kPa, $69,9 \pm 6,5$ kPa e $91,3 \pm 5,9$ kPa, respectivamente. No geral, tanto a deformação máxima quanto o módulo de compressão aumentam com o grau de oxidação, isso é ocasionado devido ao aumento do número de unidades oxidadas (formação da Base de Schiff), acarretando uma maior densidade de reticulação covalente na estrutura e, subsequentemente, um aumento na rigidez das amostras. (CUI *et al.*, 2014).

A forte capacidade de suportar grandes tensões e/ou recuperar a estrutura do material durante o descompressão é de extrema importância para a reparação de tecidos de sustentação de carga, que são frequentemente submetidos continuamente a várias tensões (RNJAK-KOVACINA *et al.*, 2015). O módulo de compressão das formulações da GCOx-CEQ, como observado na Figura 28b, foram moderadamente baixos. No entanto os valores obtidos são da mesma ordem de magnitude dos

relatados na literatura para tecidos moles do corpo, como cartilagem (entre 3 e 100 kPa), destacando o potencial dessas construções como mimetizantes da MEC (CUI *et al.*, 2014; MACIEL *et al.*, 2019).

5 CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho mostraram que a goma do cajueiro foi modificada por reação de oxidação em diferentes graus utilizando quantidades distintas de periodato de sódio e a quitosana foi modificada por reação de adição de Michael utilizando ácido acrílico, para a obtenção da carboxietilquitosana em dois graus de substituição, essas modificações foram confirmadas pelo aparecimento de suas bandas características no FTIR.

Os *scaffolds* foram sintetizados via reação base de *Schiff*. A partir das análises reológicas foram escolhidos a concentração de 2% (m/v) e a razão 1:1 (v:v) consideradas ótimas para a preparação dos suportes porosos. Foi observado que com o aumento do grau de oxidação há formação de estruturas mais rígidas, com maiores pontos de reticulação e com menores tempos de gelificação, maiores porosidades, maior distribuição média do tamanho de poros, propriedades mecânicas mais elevadas e menores perdas de massa.

Conclui-se que a utilização de matéria primas biodegradáveis e com baixas toxicidades tornam os suportes porosos à base de goma do cajueiro oxidado e carboxietil quitosana como potencial aplicação na área dos biomateriais como: na regeneração tecidual, agentes de liberação de fármaco e/ou para preenchimento de espaços, pois é possível modular as propriedades desses *scaffolds*, a partir do grau de oxidação ou do grau de substituição da carboxietil quitosana.

REFERÊNCIAS

- ABRAN, M. S.; HILGUERA, I. **Quitina y Quitosano**, Ed Ana Pastor de Abram, Peru, Cap. 1 Generalidades, 2004.
- AGUA, I.; MARINA, S.; PITSALIDIS, C.; MANTIONE, D.; FERRO, M.; IANDOLO, D.; SANCHEZ-SANCHEZ, A.; MALLIARAS, G. G.; MECERREYES, D. Conducting polymer scaffolds based on poly (3,4-ethylenedioxythiophene) and xanthan Gum for live-cell monitoring. **ACS Omega**, [S.l.], v. 3, p. 7424-7431, 2018.
- AHMED, T. A.; ALJAEID, B. M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. **Drug Design, Development and Therapy**, [S.l.], v. 10, p. 483–507, 2016.
- AL-KARAWI, A. J. M.; AL-QAISI, Z. H. J.; JAWAD AL-QAISI, A. H.; AL-JEBOORI, F. H. A. Investigation of poly(methyl acrylate) grafted chitosan as a polymeric drug carrier. **Polymer Bulletin**, [S.l.], v. 71, n. 7, p. 1575–1590, 2014.
- AMER, H.; NYPELÖ, T.; SULAEVA, I.; BACHER, M.; HENNIGES, U.; POTTHAST, A.; ROSENAU, T. Synthesis and characterization of periodate-oxidized polysaccharides: dialdehyde xylan (DAX). **Biomacromolecules**, [S.l.], v. 17, n. 9, p. 2972–2980, 2016.
- BALAKRISHNAN, B.; JOSHI, N.; JAYAKRISHNAN, A.; BANERJEE, R. 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, B.; SOMAN, D.; PAYANAM, U.; LAURENT, A.; LABARRE, D.; JAYAKRISHNAN, A. A Novel injectable tissue adhesive based on oxidized dextran and chitosan. **Acta Biomaterialia**, [S.l.], v. 53, p. 343-354, 2017.
- BANIASADI, H.; MASHAYEKHAN, S.; FADAODDINI, S.; HAGHIRSHARIFZAMINI, Y. Design, fabrication and characterization of oxidized alginate-gelatin hydrogels for muscle tissue engineering applications. **Journal of Biomaterials Applications**, [S.l.], v. 31, n. 1, p. 152–161, 2016.
- BASHIR, S.; TEO, Y. Y.; RAMESH, S.; RAMESH, K.; KHAN, A. A. N-succinyl chitosan preparation, characterization, properties and biomedical applications: A state of the art review. **Reviews in Chemical Engineering**, [S.l.], v. 31, n. 6, p. 563–597, 2015.
- BRATLIE, K. M.; XU, Z. Click chemistry and material selection for in situ fabrication of hydrogels in tissue engineering applications. **ACS Biomaterials science e engineering**, [S.l.], v. 4, n. 7, p. 2276-2291, 2018.

CABRAL, J. D.; ROXBURGH, M.; SHI, Z.; LIU, L.; MCCONNELL, M.; WILLIAMS, G.; EVANS, N.; HANTON, L. R.; SIMPSON, J.; MORATTI, S. C.; ROBINSON, B. H.; WORMALD, P. J.; ROBINSON, S. Synthesis, physicochemical characterization, and biocompatibility of a chitosan/dextran-based hydrogel for postsurgical adhesion prevention. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [S.l.], v. 25, n. 12, p. 2743–2756, 2014.

CAI, K.; ZHANG, J.; DENG, L. H.; YANG, L.; HU, Y.; CHEN, C.; XUE, L.; WANG, L. 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.

CHAUDHURY, K.; KUMAR, V.; KANDASAMY, J.; ROYCHOUDHURY, S. Regenerative nanomedicine: current perspectives and future directions. **International Journal of Nanomedicine**, [S.l.], v. 9, p. 4153–4167, 2014.

CHUNG, H. J.; PARK, T. G. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 59, n. 4–5, p. 249–262, 2007.

CUI, N.; QIAN, J.; ZHAO, N.; WANG, H. Functional hyaluronic acid hydrogels prepared by a novel method. **Materials Science and Engineering C**, [S.l.], v. 45, p. 573–577, 2014.

CUNHA, P. L. R.; MACIEL, J. S.; SIERAKOWSKI, M. R.; DE PAULAA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 85–92, 2007.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, [S.l.], v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011.

DAWLEE, S.; SUGANDHI, A.; BALAKRISHNAN, B.; LABARRE, D.; JAYAKRISHNAN, A. Oxidized chondroitin sulfate-cross-linked gelatin matrixes: A new class of hydrogels. **Biomacromolecules**, [S.l.], v. 6, n. 4, p. 2040–2048, 2005.

DE MOURA NETO, É.; DA S. MACIEL, J.; CUNHA, P. L. R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S.l.], v. 22, n. 10, p. 1953–1960, 2011.

DE PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 26, n. 3, p. 177–181, 1995.

DENG, Y.; REN, J.; CHEN, G.; LI, G.; WU, X.; WANG, G.; GU, G.; LI, J. Injectable *in situ* cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for abdominal tissue regeneration. **Scientific Reports**, [S.I.], v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

DHANDAYUTHAPANI, B.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; KUMAR, D. S. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. **International Journal of Polymer Science**, [S.I.], v. 2011, 2011.

DING, W.; ZHOU, J.; ZENG, Y.; WANG, Y. NAN; SHI, B. Preparation of oxidized sodium alginate with different molecular weights and its application for crosslinking collagen fiber. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 157, p. 1650–1656, 2017.

DOMINGUES, R. M. A.; SILVA, M.; GERSHOVICH, P.; BETTA, S.; BABO, P.; CARIDADE, S. G.; MANO, J. F.; MOTTA, A.; REIS, R. L.; GOMES, M. E. Development of injectable hyaluronic acid/cellulose nanocrystals bionanocomposite hydrogels for tissue engineering applications. **Bioconjugate Chemistry**, [S.I.], v. 26, n. 8, p. 1571–1581, 2015.

DOHERTY, P. J.; WILLIAMS, R.L.; WILLIAMS D. F.; LEE, J. C. Biomaterial-tissue interfaces, **Advances in Biomaterials**, [S.I.], v. 10, Elsevier, Amsterdam, 1992.

DORRAJ, G.; MOGHIMI, H. R. Preparation of SLN-containing thermoresponsive *in situ* forming gel as a controlled nanoparticle delivery system and investigating its rheological, thermal and erosion behavior. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, [S.I.], v. 14, n. 2, p. 347–358, 2015.

EL-AASSAR, M. R.; EL FAWAL, G. F.; KAMOUN, E. A.; FOU DA, M. M. G. Controlled drug release from cross-linked κ-carrageenan/hyaluronic acid membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 77, p. 322–329, 2015.

FANG, Y.; TAKAHASHI, R.; NISHINARI, K. Protein/polysaccharide cogel formation based on gelatin and chemically modified schizophyllan. **Biomacromolecules**, [S.I.], v. 6, n. 6, p. 3202–3208, 2005.

FATHI, A.; MITHIEUX, S. M.; WEI, H.; CHRZANOWSKI, W.; VALTCHEV, P.; WEISS, A. S.; DEHGHANI, F. Elastin based cell-laden injectable hydrogels with tunable gelation, mechanical and biodegradation properties. **Biomaterials**, [S.I.], v. 35, n. 21, p. 5425–5435, 2014.

FOSS, C.; MERZARI, E.; MIGLIARESI, C.; MOTTA, A. Silk fibroin/hyaluronic acid 3D matrices for cartilage tissue engineering. **Biomacromolecules**, [S.I.], v. 14, n. 1, p. 38–47, 2013.

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

HASSAN, M. A.; OMER, A. M.; ABBAS, E.; BASET, W. M. A.; TAMER, T. M. Preparation, physicochemical characterization and antimicrobial activities of novel two phenolic chitosan Schiff base derivatives. **Scientific Reports**, [S.I.], v. 8, n. 1, p. 11416, 2018.

HOSSEINKHANI, H.; HONG, P.; YU, D. Self-Assembled proteins and peptides for regenerative medicine. **Chemical Reviews**, [S.I.], v. 113, n. 7, p. 4837-4861, 2012.

HOZUMI, T.; KAGEYAMA, T.; OHTA, S.; FUKUDA, J.; ITO, T. Injectable hydrogel with slow degradability composed of gelatin and hyaluronic acid cross-linked by schiff's base formation. **Biomacromolecules**, [S.I.], v. 19, n. 2, p. 288–297, 2018.

HUANG, J.; XIE, H.; YE, H.; XIE, T.; LIN, Y.; GONG, J.; JIANG, C.; WU, Y.; LIU, S.; CUI, Y.; MAO, J.; MEI, L. Effect of carboxyethylation degree on the adsorption capacity of Cu(II) by N-(2-carboxyethyl)chitosan from squid pens. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 138, p. 301–308, 2016.

HUEBSCH, N.; MOONEY, D. J. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. **Nature**, [S.I.], v. 462, p. 426–432, 2009.

HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium**, [S.I.], v. 21, p. 175–189, 2006.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **Journal of the Royal Society Interface**, [S.I.], v. 3, n. 10, p. 589–601, 2006.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; NAIR, S. V.; TOKURA, S.; TAMURA, H.; SELVAMURUGAN, N. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. **Progress in Materials Science**, [S.I.], v. 55, n. 7, p. 675–709, 2010.

JIA, Y.; LI, J. Molecular assembly of Schiff base interactions: Construction and application. **Chemical Reviews**, [S.I.], v. 115, n. 3, p. 1597–1621, 2015.

KADWA, E.; FRIEDRICH, H. B.; BALA, M. D. Base metal Schiff base complexes applied as catalysts for the oxidation of n-octane. **Inorganica Chimica Acta**, [S.I.], v. 463, p. 112–117, 2017.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, [S.I.], v. 26, n. 27, p. 5474–5491, 2005.

KHUNMANEE, S.; JEONG, Y.; PARK, H. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. **Journal of Tissue Engineering**, [S.I.], v. 8, p. 1-16, 2017.

KIM, U. J.; LEE, Y. R.; KANG, T. H.; CHOI, J. W.; KIMURA, S.; WADA, M. Protein adsorption of dialdehyde cellulose-crosslinked chitosan with high amino group contents. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 163, p.34-42, 2017.

KOUTSIANITIS, D.; MITANI, C.; GIAGLI, K.; TSALAGKAS, D.; HALÁSZ, K.; KOLONICS, O.; GALLIS, C.; CSÓKA, L. Ultrasonics sonochemistry properties of ultrasound extracted bicomponent lignocellulose thin films. **Ultrasonics - Sonochemistry**, [S.I.], v. 23, p. 148–155, 2015.

KRISTIANSEN, K. A.; POTTHAST, A.; CHRISTENSEN, B. E. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. **Carbohydrate Research**, [S.I.], v. 345, n. 10, p. 1264–1271, 2010.

LANGER, R. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: One laboratory's experience. **Accounts of Chemical Research**, [S.I.], v. 33, n. 2, p. 94–101, 2000.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering. **Science**, [S.I.], v. 260, p. 920–926, 1993.

LEE, K. Y.; BOUHADIR, K. H.; MOONEY, D. J. Degradation behavior of covalently cross-linked poly(aldehyde guluronate) hydrogels. **Macromolecules**, [S.I.], v. 33, n. 1, p. 97–101, 2000.

LEITE, Á. J.; COSTA, R. R.; COSTA, A. M. S.; MACIEL, J. S.; COSTA, J. F. G.; DE PAULA, R. C. M.; MANO, J. F. The potential of cashew gum functionalization as building blocks for layer-by-layer films. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 174, p. 849–857, 2017.

LI, L.; GE, J.; MA, P. X.; GUO, B. Injectable conducting interpenetrating polymer network hydrogels from gelatin-graft-polyaniline and oxidized dextran with enhanced mechanical properties. **RSC Advances**, [S.I.], v. 5, n. 112, p. 92490–92498, 2015a.

LI, Y.; LU, T.; CHEN, T. Techniques for fabrication and construction three-dimensional scaffold for tissue engineering. **International Journal of Nanomedicine**, [S.I.], v. 8, p. 337–350, 2013.

LI, Y.; LIU, C.; TAN, Y.; XU, K.; LU, C.; WANG, P. *In situ* hydrogel constructed by starch-based nanoparticles via a Schiff base reaction. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 110, p. 87–94, 2014.

LI, Z.; YUAN, B.; DONG, X.; DUAN, L.; TIAN, H.; HE, C.; CHEN, X. Injectable polysaccharide hybrid hydrogels as scaffolds for burn wound healing. **RSC Advances**, [S.I.], v. 5, n. 114, p. 94248–94256, 2015.

LIM, S. H.; HUDSON, S. M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. **Carbohydrate Research**, [S.I.], v. 339, n. 2, p. 313–319, 2004.

LIU, L.; KONG, C.; HUO, M.; LIU, C.; PENG, L.; ZHAO, T.; WEI, Y.; QIAN, F.; YUAN, J. Schiff base interaction tuned mesoporous organosilica nanoplateforms with pH-responsive degradability for efficient anti-cancer drug delivery *in vivo*. **Chemical Communications**, [S.l.], v. 54, n. 66, p. 9190-9193, 2018.

LÜ, S.; GAO, C.; XU, X.; BAI, X.; DUAN, H.; GAO, N.; FENG, C.; XIONG, Y.; LIU, M. Injectable and self-healing carbohydrate-based hydrogel for cell encapsulation. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [S.l.], v. 7, n. 23, p. 13029–13037, 2015.

MA, P. X. Scaffolds for tissue fabrication. **Materials Today**, [S.l.], v. 7, n. 5, p. 30–40, 2004.

MACIEL, J. S.; AZEVEDO, S.; CORREIA, C. R.; COSTA, A. M. S.; COSTA, R. R.; MAGALHÃES, F. A.; DE SOUSA MONTEIRO, A. A.; COSTA, J. F. G.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; MANO, J. F. Oxidized cashew gum scaffolds for tissue engineering. **Macromolecular Materials and Engineering**, [S.l.], v. 304, n. 3, p. 1–11, 2019.

MAIA, J.; CARVALHO, R. A.; COELHO, J. F. J.; SIMÕES, P. N.; GIL, M. H. Insight on the periodate oxidation of dextran and its structural vicissitudes. **Polymer**, [S.l.], v. 52, n. 2, p. 258–265, 2011.

MALEKI, A.; PAJOOTAN, E.; HAYATI, B. Ethyl acrylate grafted chitosan for heavy metal removal from wastewater: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [S.l.], v. 51, p. 127–134, 2015.

MAGALHÃES, A. M. **Preparação e caracterização de potenciais suportes porosos (scaffolds) a base de géis de gelatina/goma do cajueiro (Anacardium Occidentale) oxidada**. 2013. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de pós-graduação de Química, Universidade Federal do Ceará, Ceará.

MELO-SILVEIRA, R. F.; FIDELIS, G. P.; PEREIRA COSTA, M. S. S.; TELLES, C. B. S.; DANTAS-SANTOS, N.; DE OLIVEIRA ELIAS, S.; RIBEIRO, V. B.; BARTH, A. L.; MACEDO, A. J.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. In vitro antioxidant, anticoagulant and antimicrobial activity and in inhibition of cancer cell proliferation by xylan extracted from corn cobs. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 409–426, 2012.

MOREIRA-TEIXEIRA, L. S.; SC, M.; MORONI, L.; PH, D.; REIS, R. L.; PH, D.; MANO, F.; PH, D. Chitosan scaffolds containing hyaluronic acid for cartilage tissue engineering. **Tissue Engineering . Part C, methods**, [S.l.], v. 17, n. 7, p. 717- 730, 2011.

MOREIRA, C. D. F.; CARVALHO, S. M.; MANSUR, H. S.; PEREIRA, M. M. Thermogelling chitosan-collagen-bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, [S.l.], v. 58, p. 1207–1216, 2016.

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.I.], v. 101, n. 1, p. 1013–1017, 2014.

MUZZARELI, R., Chitosan, em: Muzzareli (Ed.). **Natural Chelating Polymers**, Pergamon Press, Oxford, 1973, p. 144.

NAAHIDI, S.; JAFARI, M.; LOGAN, M.; WANG, Y.; YUAN, Y.; BAE, H.; DIXON, B.; CHEN, P. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, [S.I.], v. 35, n. 5, p. 530–544, 2017.

NAIR, B. P.; GANGADHARAN, D.; MOHAN, N.; SUMATHI, B.; NAIR, P. D. Hybrid scaffold bearing polymer-siloxane Schiff base linkage for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, [S.I.], v. 52, p. 333–342, 2015.

NASTI, A.; ZAKI, N. M.; DE LEONARDIS, P.; UNGPHAIBOON, S.; SANSONGSAK, P.; RIMOLI, M. G.; TIRELLI, N. Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: Systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. **Pharmaceutical Research**, [S.I.], v. 26, n. 8, p. 1918–1930, 2009.

OGRETMEN, B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. **Nature reviews. Cancer**, [S.I.], v. 18, n. 1, p. 33-50, 2017.

PAULA, R. C. M. DE; HEATLEY, F.; BUDD, P. M. Characterization of *Anacardium occidentale* exudate polysaccharide. **Polymer International**, [S.I.], v. 45, p. 37-35, 1998.

PERSSON, M.; LEHENKARI, P. P.; BERGLIN, L.; TURUNEN, S.; FINNILÄ, M. A. J.; RISTELI, J.; SKRIFVARS, M.; TUUKKANEN, J. Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem cells in a 3D Woven Scaffold. **Scientific Reports**, [S.I.], v. 8, p. 10457, 2018.

PITOMBEIRA, N. A. O.; VERAS NETO, J. G.; SILVA, D. A.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. **Carbohydrate Polymers**, [S.I.], v. 117, p. 610–615, 2015.

PONTREMOLI, C.; BOFFITO, M.; FIORILLI, S.; LAURANO, R.; TORCHIO, A.; BARI, A.; TONDA-TURO, C.; CIARDELLI, G.; VITALE-BROVARONE, C. Hybrid injectable platforms for the *in situ* delivery of therapeutic ions from mesoporous glasses. **Chemical Engineering Journal**, [S.I.], v. 340, p. 103–113, 2018.

QU, J.; ZHAO, X.; MA, P. X.; GUO, B. 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.

QUELEMES, P. V.; DE ARAÚJO, A. R.; PLÁCIDO, A.; DELERUE-MATOS, C.; MACIEL, J. S.; BESSA, L. J.; OMBREDANE, A. S.; JOANITTI, G. A.; SOARES, M. J. DOS S.; EATON, P.; DA SILVA, D. A.; LEITE, J. R. S. A. Quaternized cashew gum: An anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 157, p. 567–575, 2017.

RNJAK-KOVACINA, J.; WRAY, L. S.; BURKE, K. A.; TORREGROSA, T.; GOLINSKI, J. M.; HUANG, W.; KAPLAN, D. L. Lyophilized silk sponges: A versatile biomaterial platform for soft tissue engineering. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, [S.l.], v. 1, n. 4, p. 260–270, 2015.

RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M. DE; COSTA, S. M. O. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, [S.l.], v. 16, p. 31–36, 1993.

SARIKA, P. R.; CINTHYA, K.; JAYAKRISHNAN, A.; ANILKUMAR, P. R.; JAMES, N. R. Modified gum arabic cross-linked gelatin scaffold for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, [S.l.], v. 43, p. 272–279, 2014.

SARKER, B.; LI, W.; ZHENG, K.; DETSCH, R.; BOCCACCINI, A. R. Designing porous bone tissue engineering scaffolds with enhanced mechanical properties from composite hydrogels composed of modified alginate, gelatin, and bioactive glass. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, [S.l.], v. 2, n. 12, p. 2240–2254, 2016.

SCHIFF, H. Mittheilungen aus dem Universitätslaboratorium in Pisa: Eine neue Reihe organischer Basen. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, [S.l.], v. 131, n. 1, p. 118–119, 1864.

SILVA, D. A.; MACIEL, J. S.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Polysaccharide-based nanoparticles formation by polyelectrolyte complexation of carboxymethylated cashew gum and chitosan. **Journal of Materials Science**, [S.l.], v. 45, n. 20, p. 5605–5610, 2010.

SINGH, D.; SINGH, D.; HAN, S. S. 3D printing of scaffold for cells delivery: Advances in skin tissue engineering. **Polymers**, [S.l.], v. 8, n. 19, p. 1–17, 2016.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2006. 2 v. ISBN 8521614497

SU, H.; ZHANG, W.; WU, Y.; HAN, X.; LIU, G.; JIA, Q.; SHAN, S. Schiff base-containing dextran nanogel as pH-sensitive drug delivery system of doxorubicin: Synthesis and characterization. **Journal of Biomaterials Applications**, [S.l.], v. 33,

n. 2, p. 170–181, 2018.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of the Royal Society Interface**, [S.I.], v. 6, n. 3, p. 311-324, 2009.

VALENTE, J. F. A.; GASPAR, V. M.; ANTUNES, B. P.; COUNTINHO, P.; CORREIA, I. J. Microencapsulated chitosan-dextran sulfate nanoparticles for controlled delivery of bioactive molecules and cells in bone regeneration. **Polymer**, [S.I.], v. 54, n. 1, p. 5–15, 2013.

VANICHVATTANADECHA, C.; SUPAPHOL, P.; NAGASAWA, N.; TAMADA, M.; TOKURA, S.; FURUIKE, T.; TAMURA, H.; RUJIRAVANIT, R. Effect of gamma radiation on dilute aqueous solutions and thin films of N-succinyl chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, [S.I.], v. 95, n. 2, p. 234–244, 2010.

WANG, S.; VARGHESE, O. P.; OOMMEN, O. P.; YAN, H. Mild and efficient strategy for site-selective aldehyde modification of glycosaminoglycans: Tailoring hydrogels with tunable release of growth factor. **Biomacromolecules**, [S.I.], v. 14, n. 7, p. 2427–2432, 2013.

WENG, L.; CHEN, X.; CHEN, W. Rheological characterization of *in situ* crosslinkable hydrogels formulated from oxidized dextran and N-carboxyethyl chitosan. **Biomacromolecules**, [S.I.], v. 8, n. 4, p. 1109–1115, 2007.

WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials, **Journal of Polymer Science**, [S.I.], v. 26, n. 9, p. 414-414, 1987.

XIN, Y.; YUAN, J. Schiff's base as a stimuli-responsive linker in polymer chemistry. **Polymer Chemistry**, [S.I.], v. 3, n. 11, p. 3045–3055, 2012.

XU, R.; AOTEGEN, B.; ZHONG, Z. Synthesis, characterization and biological activity of C6-Schiff bases derivatives of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 105, p. 1563–1571, 2017.

YAN, H.; CHEN, X.; FENG, M.; SHI, Z.; ZHANG, D.; LIN, Q. Layer-by-layer assembly of 3D alginate-chitosan-gelatin composite scaffold incorporating bacterial cellulose nanocrystals for bone tissue engineering. **Materials Letters**, [S.I.], v. 209, p. 492–496, 2017.

YAN, S.; WANG, T.; FENG, L.; ZHU, J.; ZHANG, K.; CHEN, X.; CUI, L.; YIN, J. Injectable *in situ* self-cross-linking hydrogels based on poly(l -glutamic acid) and alginate for cartilage tissue engineering. **Biomacromolecules**, [S.I.], v. 15, n. 12, p. 4495–4508, 2014.

YAN, S.; ZHANG, X.; ZHANG, K.; DI, H.; FENG, L.; LI, G.; FANG, J.; CUI, L.; CHEN, X.; YIN, J. Injectable *in situ* forming poly(l-glutamic acid) hydrogels for cartilage tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry B**, [S.I.], v. 4, n. 5, p. 947–961, 2016.

YANG, S.; DONG, Q.; YANG, H.; LIU, X.; GU, S.; ZHOU, Y.; XU, W. N-carboxyethyl chitosan fibers prepared as potential use in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 82, p. 1018–1022, 2016.

YOOK, S. W.; JUNG, H. DO; PARK, C. H.; SHIN, K. H.; KOH, Y. H.; ESTRIN, Y.; KIM, H. E. Reverse freeze casting: A new method for fabricating highly porous titanium scaffolds with aligned large pores. **Acta Biomaterialia**, [S.l.], v. 8, n. 6, p. 2401–2410, 2012.

YUAN, L.; WU, Y.; GU, Q. SHENG; EL-HAMSHARY, H.; EL-NEWEHY, M.; MO, X. Injectable photo crosslinked enhanced double-network hydrogels from modified sodium alginate and gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 96, p. 569–577, 2017.

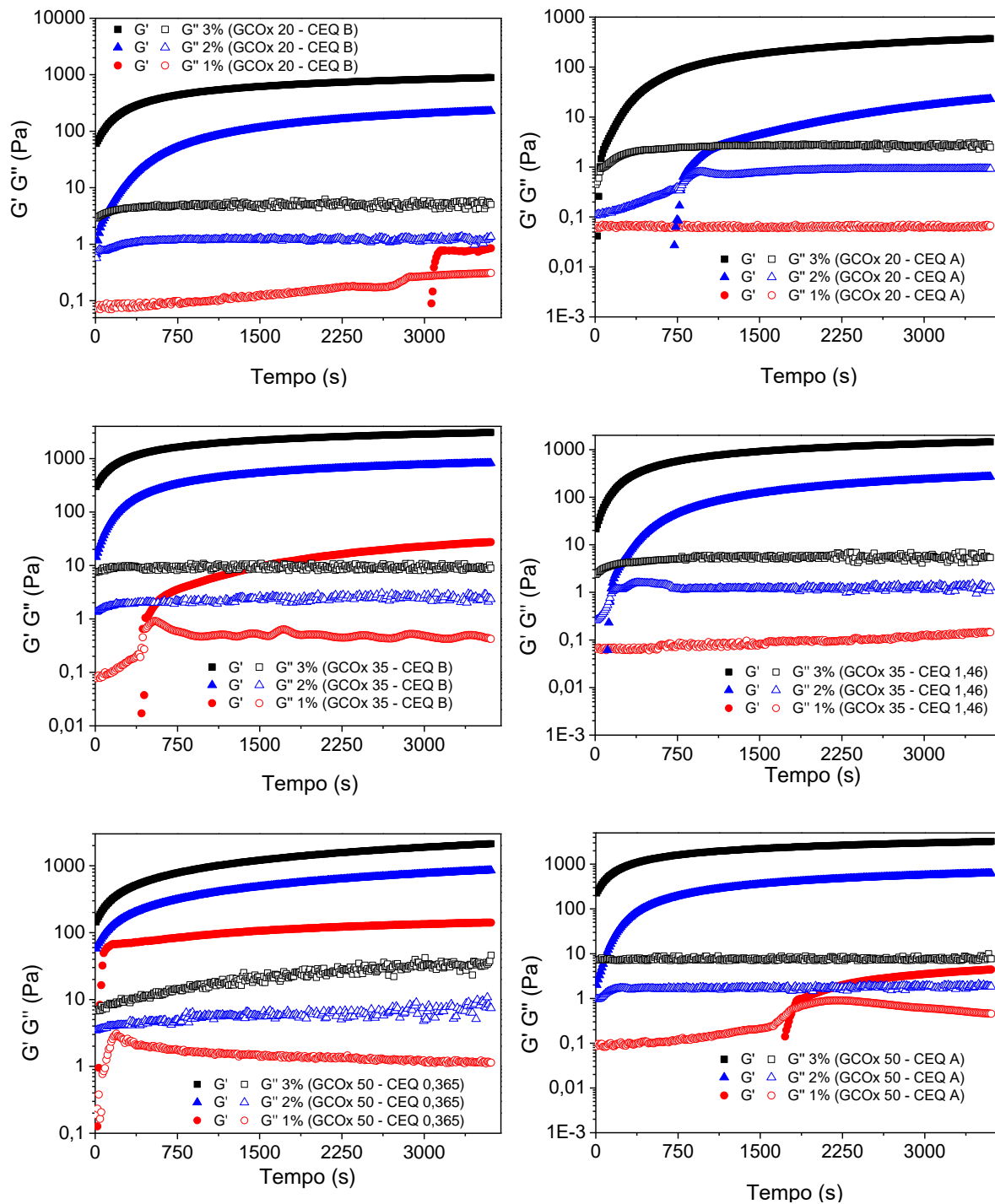
ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. **ChemBioEng Reviews**, [S.l.], v. 2, n. 3, p. 204–226, 2015.

ZENG, J. B.; HE, Y. S.; LI, S. L.; WANG, Y. Z. Chitin whiskers: An overview. **Biomacromolecules**, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 1–11, 2012.

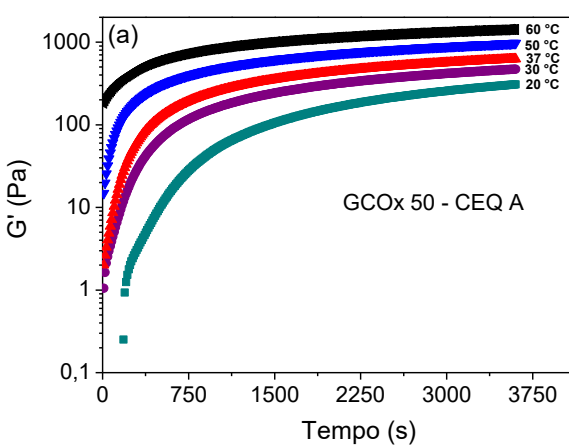
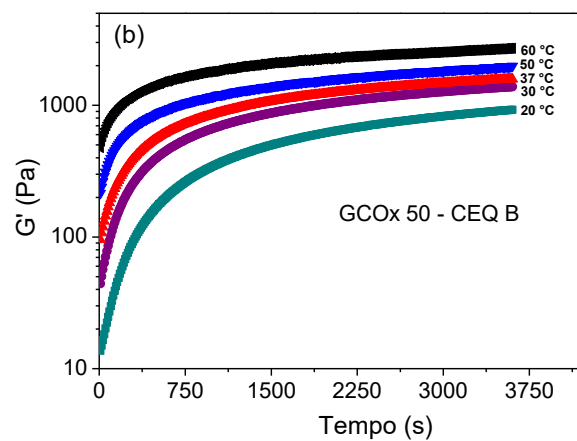
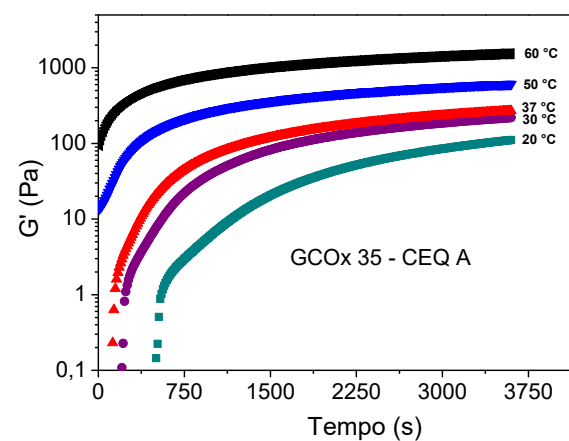
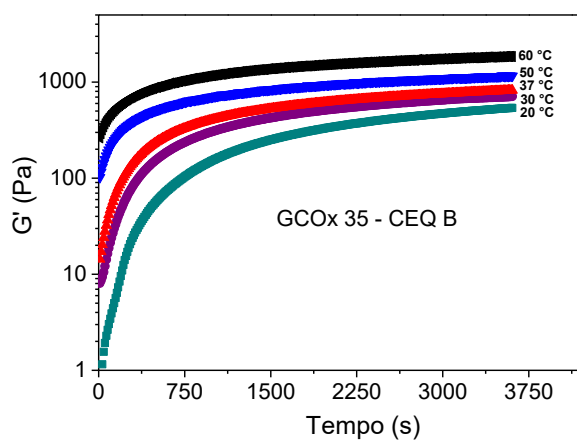
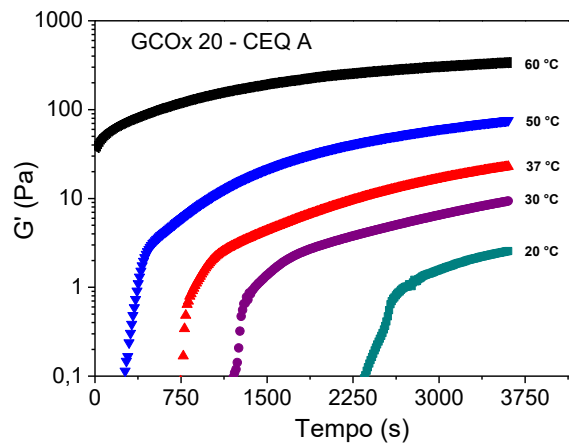
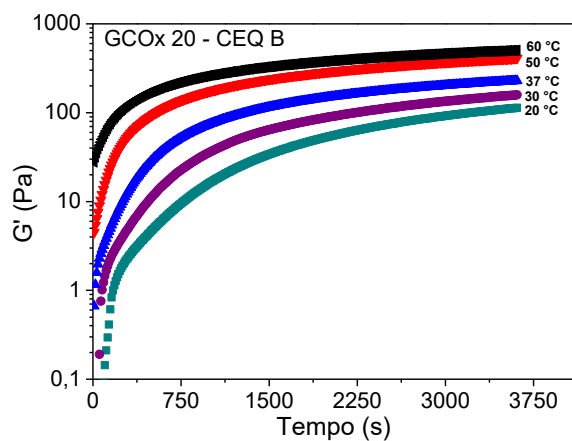
ZHAO, H.; HEINDEL, N. D. Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method. **Pharmaceutical Research**, [S.l.], v. 8, n. 3, p. 400-402, 1991.

APÊNDICE

APÊNDICE A – MÓDULO G' E G'' EM FUNÇÃO DO TEMPO DURANTE A GELIFICAÇÃO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.



APÊNDICE B – MÓDULO ELÁSTICO G' EM FUNÇÃO DO TEMPO DURANTE O PROCESSO DE GELIFICAÇÃO DOS SISTEMAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS.



APÊNDICE C – MÉDIA DOS DIÂMETROS DE POROS PARA GÉIS DE DIFERENTES GRAUS DE OXIDAÇÃO DA GCOX.

