



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

CARLOS RHAMON DO NASCIMENTO FERREIRA

HIDROGÉIS INJETÁVEIS À BASE DE GOMA GUAR E
CARBOXIETILQUITOSANA REFORÇADOS COM NANOPARTÍCULAS DE
VIDRO BIOATIVO COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE
TECIDOS

FORTALEZA

2024

CARLOS RHAMON DO NASCIMENTO FERREIRA

HIDROGÉIS INJETÁVEIS À BASE DE GOMA GUAR E CARBOXIETILQUITOSANA
REFORÇADOS COM NANOPARTÍCULAS DE VIDRO BIOATIVO COM POTENCIAL
APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal do Ceará
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor (a) em Química. Área de
concentração: Química
Orientadora: Prof^a. Dra. Jeanny da Silva
Maciel.
Coorientadora: Prof^a. Dra. Judith Pessoa de
Andrade Feitosa

FORTALEZA

2024

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

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

- F44h Ferreira, Carlos Rhamon do Nascimento.
Hidrogéis injetáveis à base de goma guar e carboxietilquitosana reforçados com nanopartículas de vidro bioativo com potencial aplicação na engenharia de tecidos / Carlos Rhamon do Nascimento Ferreira. – 2024.
116 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Jeanny da Silva Maciel.
Coorientação: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.
1. Hidrogéis injetáveis. 2. Quitosana. 3. Goma guar. 4. Base de Schiff. 5. Vidro Bioativo. I. Título.
CDD 540
-

CARLOS RHAMON DO NASCIMENTO FERREIRA

HIDROGÉIS INJETÁVEIS À BASE DE GOMA GUAR E CARBOXIETILQUITOSANA
REFORÇADOS COM NANOPARTÍCULAS DE VIDRO BIOATIVO COM POTENCIAL
APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS.

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

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Prof. Dr. Francisco Audísio Dias Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Durcilene Alves da Silva
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Profa. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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.

Quero expressar minha sincera gratidão a Samira Melo Nogueira pela paciência e apoio inabaláveis durante todo esse período. Sua compreensão e incentivo foram fundamentais para superar os desafios acadêmicos e emocionais. Agradeço por estar ao meu lado, mesmo nos momentos mais estressantes, e por ser a âncora que me manteve equilibrado. Sua paciência infinita foi uma luz que iluminou meu caminho, tornando esta jornada acadêmica mais significativa e suportável. Sou imensamente grato por ter você como minha companheira nesta trajetória.

Ao meu grande amigo e irmão Irisvan Ribeiro que desde a graduação veio me incentivando, ajudando e dando conselhos em todos os momentos dessa caminhada.

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 (Labpol) Judith Feitosa, Regina de Paula e Pablyana da Cunha por todo o suporte e disponibilidade.

A todos do Labpol por toda paciência e incentivo para a realização desse trabalho.

Aos alunos de Iniciação Científica Pedro e Adisom pelas ajudas no desenvolvimento do trabalho.

A Raelle Ferreira Gomes por sua amizade, conversas e imagens desse 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.

A Nádia pelas análises de FTIR.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da UFC.

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

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

“Só quem já perdeu na vida sabe o que é ganhar,
porque encontrou na derrota o motivo para
lutar”

(Desconhecido)

RESUMO

Hidrogéis são uma classe de materiais poliméricos que constituem uma promissora aplicação em engenharia de tecidos e medicina regenerativa por apresentar semelhanças com a matriz extracelular natural dos tecidos. Os hidrogéis injetáveis constituem uma subclasse de hidrogéis que podem ser aplicados diretamente na lesão tecidual para preencher e sustentar a regeneração do tecido. Uma forma de proporcionar maior resistência mecânica aos hidrogéis é adicionar agentes de reforço, como nanopartículas de vidro bioativo, que além de serem biodegradáveis, biocompatíveis e osteocondutores, induzem a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada na interface biomaterial/tecido. Inicialmente a goma guar despolimerizada pelo tratamento ácido-etanol foi oxidada em diferentes graus de oxidação (30, 50 e 70%) utilizando periodato de sódio e a quitosana foi carboxietilada a partir da reação de adição de Michael com ácido acrílico, passando a ser solúvel em ampla faixa de pH. As principais técnicas utilizadas para caracterizar os polissacarídeos e suas modificações foram: FTIR, RMN ^1H e GPC. As nanopartículas de vidro bioativo obtidas tiveram tamanho médio de 138 ± 29 nm, forma esférica com morfologia lisa e uma distribuição de tamanho uniforme. Os hidrogéis formulados tiveram tempos de gelificação de 37 a 97 segundos, aumentando com a presença do vidro bioativo. Os hidrogéis injetáveis tiveram uma excelente injetabilidade/seringabilidade sem apresentar interrupção do fluxo e sem obstrução da cânula. O MEV mostrou que os hidrogéis são formados por uma rede porosa e interconectada com valores médios de poros entre 123 ± 5 a 356 ± 15 μm e com uma porosidade de $66,3 \pm 1,4$ a $87,4 \pm 2,1$ (%); diminuindo seus valores com a presença do vidro bioativo. Os estudos de degradação em PBS mostraram que os hidrogéis apresentam uma perda de massa lenta durante o período de 28 dias (com degradação média de 30 a 50% de sua massa inicial) e o intumescimento das amostras apresentou valores controlados durante o tempo de 180 minutos (variando de 30 a 45% da sua massa inicial). Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* utilizando duas linhagens de células (fibroblastos e osteoblasto) confirmaram a natureza não-tóxica e biocompatível das formulações estudadas. Assim é possível verificar que os hidrogéis apresentam potencial aplicação na regeneração de tecidos, visto que mostram uma facilidade na manipulação de suas propriedades estudadas.

Palavras-chave: hidrogéis injetáveis; quitosana; goma guar; base de *Schiff*; vidro bioativo.

ABSTRACT

Hydrogels are a class of polymeric materials that constitute a promising application in tissue engineering and regenerative medicine due to their similarities with the natural extracellular matrix of tissues. Injectable hydrogels constitute a subclass of hydrogels that can be applied directly to tissue injury to fill and support tissue regeneration. One way to provide greater mechanical resistance to hydrogels is to add reinforcing agents, such as bioactive glass nanoparticles, which in addition to being biodegradable, biocompatible and osteoconductive, induce the formation of a layer of carbonated hydroxyapatite at the biomaterial/tissue interface. Initially, the guar gum depolymerized by the acid-ethanol treatment was oxidized to different degrees of oxidation (30, 50 and 70%) using sodium periodate and the chitosan was carboxyethylated from the Michael addition reaction with acrylic acid, becoming soluble in a wide pH range. The main techniques used to characterize polysaccharides and their modifications were: FTIR, ^1H NMR and GPC. The obtained bioactive glass nanoparticles had an average size of 138 ± 29 nm, spherical shape with smooth morphology and a uniform size distribution. The formulated hydrogels had gelation times of 37 to 97 seconds, increasing with the presence of bioactive glass. The injectable hydrogels had excellent injectability/syringability without interrupting the flow or obstructing the cannula. The SEM showed that the hydrogels are formed by a porous and interconnected network with average pore values between 123 ± 5 to 356 ± 15 μm and with a porosity of 66.3 ± 1.4 to 87.4 ± 2.1 (%); decreasing their values with the presence of bioactive glass. Degradation studies in PBS showed that the hydrogels showed a slow loss of mass over a period of 28 days (with an average degradation of 30 to 50% of their initial mass) and the swelling of the samples showed controlled values during a period of 180 minutes. (ranging from 30 to 45% of its initial mass). In vitro cytotoxicity assays using two cell lines (fibroblasts and osteoblasts) confirmed the non-toxic and biocompatible nature of the studied formulations. Thus, it is possible to verify that hydrogels have potential application in tissue regeneration, as they show ease in manipulating their studied properties.

Keywords: injectable hydrogels; chitosan; guar gum; *Schiff* base; bioactive glass.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Esquema para aplicação de hidrogéis injetáveis na regeneração do tecido ósseo.....	18
Figura 2	- Mecanismo de formação da reação de base de <i>Schiff</i>	19
Figura 3	- Estrutura química da Goma Guar (GG) com razão molar M:G de 2:1.....	22
Figura 4	- Seletividade da reação do periodato em uma unidade de galactose com padrão de ligação 1→4.....	22
Figura 5	- Representação da estrutura química da quitosana parcialmente desacetilada	23
Figura 6	- Fontes de extração de Quitina.....	24
Figura 7	- Reação de Carboxietilação da Quitosana (CEQ).....	25
Figura 8	- Ilustração esquemática da sequência de reações que levam a formação de HCA em SBF.....	27
Figura 9	- Principais aplicações de hidrogéis injetáveis em tecido ósseo.....	29
Figura 10	- Fluxograma das etapas desenvolvidas no presente trabalho.....	31
Figura 11	- Representação esquemática da análise de injetabilidade.....	43
Figura 12	- Representação esquemática do aparato para análise de seringabilidade.....	44
Figura 13	- Curva de calibração da Tetra em tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L ⁻¹) no UV-vis ($\lambda = 362$ nm).....	46
Figura 14	- Cromatogramas de GPC da GGP e GGD (A) e curvas de viscosidades (B) para as soluções aquosas de GGP e GGD em diferentes tempos de reação de despolimerização.....	48
Figura 15	- Espectro na região de infravermelho para GGP e GGD.....	51
Figura 16	- Espectro de RMN ¹ H para a GGP e GGD obtidos a 70 °C em D ₂ O.....	52
Figura 17	- Reação de oxidação de uma unidade de galactose da cadeia lateral da goma guar.....	53
Figura 18	- Representação da reação entre uma unidade de manose oxidada e NH ₂ OH.HCl.....	53
Figura 19	- Curva de titulação dos derivados oxidados com NaOH 0,1 mol L ⁻¹ , para GGD, GGOx 30, GGOx 50 e GGOx 70.....	55
Figura 20	- Espectros de FTIR da GGD, GGP e seus derivados oxidados e amplitude da região entre 1500 a 1800 cm ⁻¹ do espectro.....	56
Figura 21	- Espectros RMN ¹ H da GGD e de seus derivados oxidados obtidos a 70 °C em D ₂ O.....	57

Figura 22	- Cromatogramas de GPC da GGP, GGD e dos seus derivados oxidados.....	58
Figura 23	- Variação do pH durante a reação de oxidação da goma guar com periodato de sódio.....	59
Figura 24	- Liberação de ácido fórmico a partir de uma unidade de galactose.....	60
Figura 25	- RMN ¹ H das reações de carboxietilação via reação de Michael em diferentes condições de razão molar de ácido acrílico/CEQ (A), diferentes temperaturas (B) e mudança nos dias reacionais (C).....	61
Figura 26	- Quitosana carboxietilada e suas diferentes estruturas substituídas.....	63
Figura 27	- FTIR da quitosana e carboxietilquitosana em pastilhas de KBr.....	65
Figura 28	- Espectro de RMN ¹ H para QT e CEQ a 25 °C em D ₂ O/DCI.....	66
Figura 29	- Solubilidade das amostras de CEQ e QT purificada em diferentes pH a 25 °C.....	68
Figura 30	- Protonação e desprotonação dos grupamentos amins e carboxietil em diferentes valores de pH.....	69
Figura 31	- Aparência macroscópica das soluções de CEQ comparadas à da quitosana não modificada (todas nas concentrações de 2,0% m/v)	70
Figura 32	- Imagens das nanopartículas de vidro bioativo obtidas por MEV (A) e (B) e AFM (C) e (D).....	72
Figura 33	- Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio (A) e distribuição de tamanhos de poros (B) (algoritmo BET derivado das curvas de dessorção) das nanopartículas de VB.....	74
Figura 34	- Padrão de DRX para as nanopartículas de vidro bioativo (VB).....	75
Figura 35	- Espectros de FTIR obtido para as amostras de vidro bioativo (VB).....	76
Figura 36	- Módulo de armazenamento obtido para as amostras de hidrogéis com vidro bioativo (VB) em diferentes porcentagens. (A) Hidrogel GGOx30-CEQ-VB; (B) GGOx50-CEQ-VB; (C) GGOx70-CEQ-VB.....	78
Figura 37	- Evolução do módulo de armazenamento (G') e de perda (G'') com o tempo para GGOx-CEQ-VB. Sem VB (A) e com VB (B) (5%). O tempo de cruzamento G' e G'' é denominado como crossover t _{gel} (ponto de gelificação).....	80
Figura 38	- Espectros de FTIR obtido para as amostras dos hidrogéis em suas diferentes formulações.....	82

Figura 39	- Intumescimento dos hidrogéis por três horas em PBS (0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4), em diferentes graus de oxidação sem (A) e com (B) VB.....	83
Figura 40	- Cinética de degradação <i>in vitro</i> das diferentes formulações dos géis de GGOx-CEQ sem (A) e com (B) VB em PBS (0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4) a 37 °C e 100 rpm.....	85
Figura 41	- Microscopia eletrônica de varredura das amostras de GGOx 30-CEQ (A), GGOx 50-CEQ (B), GGOx 70-CEQ (C), GGOx 30-CEQ-VB (D), GGOx 50-CEQ-VB (E), GGOx 70-CEQ-VB (F) e GGOx 50-CEQ-VB (G) com zoom para evidenciar as nanopartículas de vidro (VB) na estrutura do <i>scaffolds</i> (todas as micrografias apresentam magnificação de 250x e escala de 200 µm).....	87
Figura 42	- Valores de porosidade dos géis de GGOx-CEQ com e sem VB.....	90
Figura 43	- Injeção dos hidrogéis em seringas de 1 mL 26G (0,45x13 mm).....	91
Figura 44	- Propriedade de autocura dos hidrogéis GGOx 50-CEQ-VB. Valores de G' e G'' para <i>strain sweep</i> ($\gamma = 0,1\%-100\%$) (A) com uma frequência angular fixada em (10 rad s ⁻¹). G' e G'' mudando de baixa deformação ($\gamma = 1,0\%$) para alta deformação ($\gamma = 60,0\%$) (B) com uma frequência angular fixada em (10 rad s ⁻¹) no ciclo de <i>strain</i> . Cada intervalo de ciclo foi mantido por 100 s. Viscosidade determinada por reologia oscilatória do hidrogel (C). Imagem da formação dos hidrogéis através da formação da base de <i>Schiff</i> com vidro bioativo incorporada em sua rede tridimensional (D).....	94
Figura 45	- Liberação cumulativa da tetraciclina incorporada aos hidrogéis com e sem vidro bioativo.....	95
Figura 46	- Percentual da viabilidade celular em células de fibroblasto murino L929 após 72 horas de incubação com as amostras, determinado pelo método do MTT.....	98
Figura 47	- Imagens representativas de células L929 após 72 horas de incubação na ausência ou presença dos hidrogéis. Imagens em escala de 100 µm.....	99
Figura 48	- Avaliação da citotoxicidade dos materiais em linhagem osteoblasto.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Resistência e contato da camada de ligação de biomateriais.....	28
Tabela 2	- Requisitos básicos para um <i>scaffolds</i> ideal na engenharia de tecido ósseo.....	28
Tabela 3	- Comparação dos valores da massa molar da GGP e GGD em diferentes tempos de reação.....	49
Tabela 4	- Dados reacionais da goma da goma guar com periodato de sódio a temperatura ambiente	54
Tabela 5	- Comparação dos valores da massa molar da GGP e GGD e de seus derivados oxidados.....	59
Tabela 6	- Reação de carboxietilação via reação de Michael em diferentes condições reacionais e seu efeito sobre o GD na solubilidade em água.....	64
Tabela 7	- Solubilidade da QT e CEQ em solução aquosa em diferentes valores de pH.....	67
Tabela 8	- Composição química nominal e composição química obtida através de ICP-OES das partículas de vidro obtidas.....	71
Tabela 9	- Comparação dos diâmetros das nanopartículas de vidro bioativo obtidos pelas técnicas DLS, MEV e AFM e os valores de potencial zeta.....	73
Tabela 10	- Propriedades texturais obtidas pelos métodos BET para as nanopartículas de VB.....	74
Tabela 11	- Tempo de gelificação para os hidrogéis (concentração de 2% (m/v) e temperatura de 37 °C) formulados a partir de GGOx e CEQ.....	81
Tabela 12	- Perda de massa dos hidrogéis a partir dos experimentos de cinética de degradação em PBS (0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4) a 37 °C e 100 rpm.....	85
Tabela 13	- Tamanho médio dos poros com n=50 medidos por Image J.....	89
Tabela 14	- Seringabilidade dos hidrogéis por uma agulha de 21G ^{1/4} (25x0,8 mm).....	93
Tabela 15	- Parâmetros estimados pelo modelo cinético de Zeng para liberação cumulativa da tetraciclina dos hidrogéis.....	96
Tabela 16	- Percentual da viabilidade celular <i>in vitro</i> em células não-tumorais após 72 horas de incubação com as amostras, determinado pelo método do MTT. VC – Viabilidade Celular; EPM – Erro Padrão da Média.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Acrílico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
CEQ	Carboxietilquitosana
<i>Crossover</i>	Cruzamento entre os módulos de armazenamento e perda
GPC	Cromatografia de permeação em gel
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ET	Engenharia de Tecidos
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier
SLA	Estereografia
GD	Grau de Desacetilação
GG	Goma Guar
GGOx	Goma Guar Oxidada
GS	Grau de Substituição
GGP	Goma Guar Purificada
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
RMN	Ressonância magnética nuclear
PBS	Solução tampão fosfato salina
T_{gel}	Tempo de geleificação
$\alpha_{(máx)}$	Tensão de compressão máxima
u.a	Unidades arbitrárias
VB	Vidro bioativo
V_e	Volume de eluição

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Engenharia de tecidos.....	17
1.2	Hidrogéis na engenharia de tecidos.....	18
<i>1.2.1</i>	<i>Hidrogéis injetáveis.....</i>	<i>18</i>
<i>1.2.2</i>	<i>Hidrogéis via formação de base de Schiff.....</i>	<i>19</i>
1.3	Galactomananas e derivados oxidados.....	21
1.4	Quitosana e Carboxietilquitosana.....	23
1.5	 Vidro Bioativo.....	26
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	Objetivo geral.....	30
2.2	Objetivos específicos.....	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1	Etapas de desenvolvimento do trabalho.....	31
3.2	Materiais.....	31
3.3	Purificação da Goma Guar (GGP).....	32
<i>3.3.1</i>	<i>Despolimerização da goma guar (GGD).....</i>	<i>32</i>
<i>3.3.2</i>	<i>Solubilidade e reologia de fluxo.....</i>	<i>32</i>
3.4	Oxidação da goma guar e determinação do grau de oxidação.....	33
3.5	Purificação da quitosana (QT).....	34
3.6	Síntese da N-carboxietilquitosana (CEQ).....	34
3.7	Caracterização da goma guar e seus derivados, quitosana e carboxietilquitosana.....	35
<i>3.7.1</i>	<i>Cromatografia de permeação em gel (GPC).....</i>	<i>35</i>
<i>3.7.2</i>	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....</i>	<i>35</i>
<i>3.7.3</i>	<i>Ressonância magnética nuclear (RMN).....</i>	<i>35</i>
<i>3.7.4</i>	<i>Determinação do grau de desacetilação da quitosana e grau de substituição da carboxietilquitosana.....</i>	<i>36</i>
<i>3.7.5</i>	<i>Determinação da solubilidade em diferentes pH da carboxietilquitosana (CEQ) em meio aquoso.....</i>	<i>36</i>

3.8	Síntese das nanopartículas de vidro bioativo (VB).....	37
3.9	Caracterização do vidro bioativo (VB).....	38
3.9.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....</i>	38
3.9.2	<i>Composição química do vidro bioativo por ICP-OES.....</i>	38
3.9.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</i>	38
3.9.4	<i>Microscopia por força atômica (AFM).....</i>	38
3.9.5	<i>Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....</i>	39
3.9.6	<i>Propriedades texturais.....</i>	39
3.9.7	<i>Difração de raio X (DRX).....</i>	39
3.10	Preparação dos hidrogéis.....	40
3.11	Caracterização dos hidrogéis.....	40
3.11.1	<i>Análise mecânica dos hidrogéis por análise reológica.....</i>	40
3.11.2	<i>Determinação do tempo de geleificação dos hidrogéis.....</i>	41
3.11.3	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....</i>	41
3.11.4	<i>Avaliação da capacidade de absorção de água (intumescimento) dos hidrogéis</i>	41
3.11.5	<i>Avaliação da perda de massa (degradação) in vitro dos hidrogéis.....</i>	42
3.11.6	<i>Avaliação da porosidade dos hidrogéis.....</i>	42
3.11.7	<i>Análise morfológica dos hidrogéis por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</i>	43
3.11.8	<i>Avaliação da injetabilidade in vitro dos hidrogéis.....</i>	43
3.11.9	<i>Avaliação da seringabilidade dos hidrogéis.....</i>	44
3.11.10	<i>Avaliação das propriedades de Self-healing (autocura).....</i>	44
3.11.11	<i>Preparação dos hidrogéis com tetraciclina e ensaio de liberação.....</i>	45
3.12	Caracterização biológica <i>in vitro</i> dos hidrogéis.....	46
3.12.1	<i>Análise dos produtos em linhagem de fibroblastos (L929).....</i>	46
3.12.2	<i>Análise dos produtos em linhagem de osteoblastos.....</i>	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1	Caracterização da goma guar e seus derivados oxidados.....	48
4.1.1	<i>Degradação ácido/etanol da GGP e GGD.....</i>	48
4.1.2	<i>FTIR e RMN ¹H da GGP e GGD.....</i>	50
4.1.3	<i>Determinação do grau de oxidação por titulação potenciométrica.....</i>	52

4.1.4	<i>Caracterização dos derivados oxidados por FTIR e RMN ¹H.....</i>	55
4.1.5	<i>Estimativa da massa molar da GGD e seus derivados oxidados.....</i>	58
4.1.6	<i>Variação do pH durante a reação de oxidação da goma guar oxidada.....</i>	59
4.2	<i>Caracterização da quitosana (QT) e carboxietilquitosana (CEQ).....</i>	60
4.2.1	<i>RMN ¹H da carboxietilquitosana.....</i>	60
4.2.2	<i>FTIR e RMN ¹H da quitosana (QT) e carboxietilquitosana (CEQ).....</i>	64
4.2.3	<i>Determinação da solubilidade em diferentes pH da carboxietilquitosana (CEQ) em meio aquoso.....</i>	66
4.3	<i>Caracterização das nanopartículas de vidro bioativo (VB).....</i>	71
4.3.1	<i>Análise da composição química por espectroscopia de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES).....</i>	71
4.3.2	<i>Avaliação das propriedades morfológicas e texturais das nanopartículas.....</i>	72
4.3.3	<i>Propriedades texturais das nanopartículas obtidas por Brunauer-Emmett-Teller (BET).....</i>	73
4.3.4	<i>Análise por difração de raio X (DRX).....</i>	75
4.3.5	<i>Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) para as nanopartículas de vidro bioativo.....</i>	75
4.4	<i>Caracterização dos hidrogéis.....</i>	77
4.4.1	<i>Análise reológica dos hidrogéis.....</i>	77
4.4.2	<i>Tempo de gelificação para os hidrogéis com e sem vidrobioativo (VB).....</i>	79
4.4.3	<i>Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) para os hidrogéis.....</i>	82
4.4.4	<i>Avaliação da capacidade de absorção (intumescimento) dos hidrogéis.....</i>	83
4.4.5	<i>Avaliação da perda de massa (degradação) in vitro dos hidrogéis.....</i>	84
4.4.6	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos hidrogéis.....</i>	86
4.4.7	<i>Avaliação da porosidade dos hidrogéis.....</i>	89
4.4.8	<i>Injetabilidade in vitro.....</i>	91
4.4.9	<i>Avaliação da seringabilidade dos hidrogéis.....</i>	92
4.4.10	<i>Avaliação do comportamento de autocura (Self-healing) dos hidrogéis.....</i>	93
4.4.11	<i>Liberação da tetraciclina incorporada ao hidrogel.....</i>	95
4.5	<i>Caracterização biológica in vitro dos hidrogéis.....</i>	97
4.5.1	<i>Análise dos produtos em linhagem de fibroblastos (L929).....</i>	97
4.5.2	<i>Análise dos produtos em linhagem de osteoblastos.....</i>	100

5	CONCLUSÃO.....	101
	REFERÊNCIAS.....	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 Engenharia de tecidos

A crescente tendência mundial do aumento da expectativa de vida, aliada às sérias limitações no uso de transplantes utilizando enxertos alogênicos (autólogos – que são transplantados entre indivíduos da mesma espécie ou xenogênicos – que são transplantados em indivíduos de espécie diferentes), estimulou cientistas de todo o mundo a investir na busca de novos substitutos teciduais alternativos (STEFFENS *et al.*, 2018). Como consequência desses problemas, 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 (MANDRYCKY; PHONG; ZHENG, 2017). A engenharia de tecidos (ET) e a medicina regenerativa surgiram em meados dos anos 60 com o objetivo de sanar esses problemas (VACANTI, 2006).

Segundo Langer e Vacanti (1993), a engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que aplica os princípios de engenharia e das ciências da vida para desenvolver substituintes biológicos que restauram, mantém, ou aumentam a função de um tecido, e uma das estratégias adotada por este campo é a utilização de biomateriais como suporte para o desenvolvimento de células em seu interior que possam promover a reparação e a regeneração dos tecidos lesados (STEFFENS *et al.*, 2018).

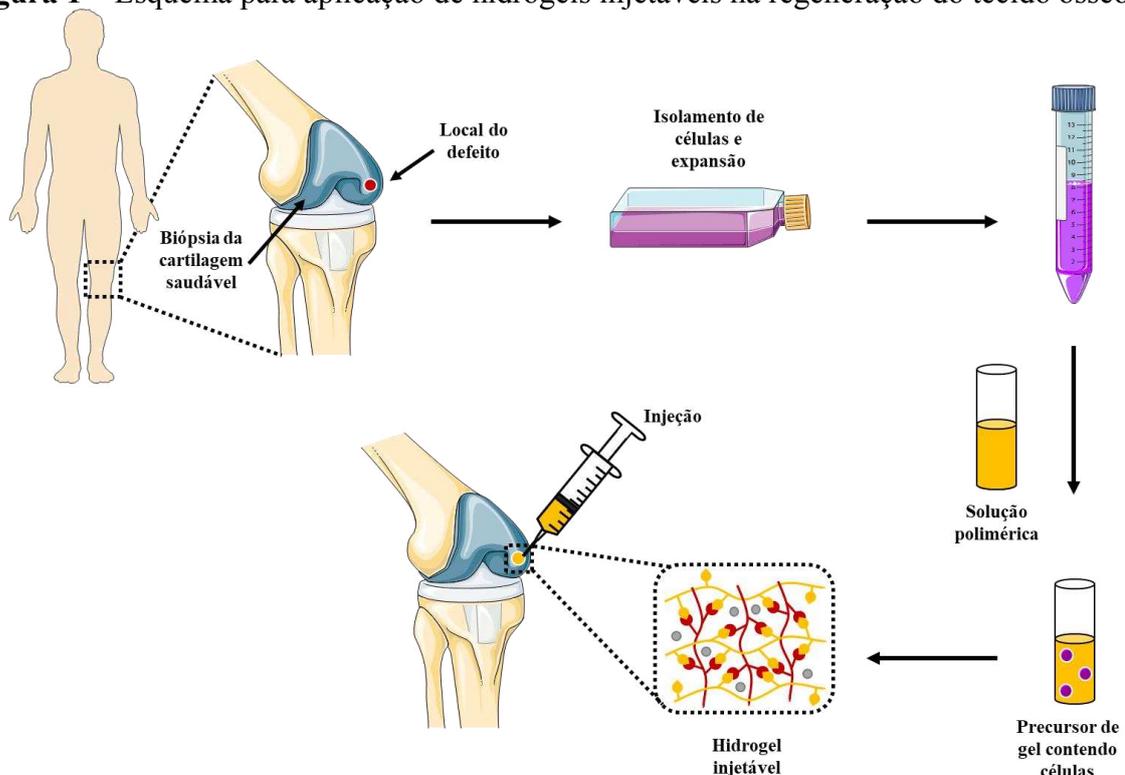
Nas últimas décadas, os suportes desenvolvidos a partir de hidrogéis têm sido amplamente utilizados em muitas aplicações biomédicas, devido principalmente a sua semelhança estrutural com a matriz extra-celular. O alto teor de água, a porosidade controlável e a biocompatibilidade, são propriedades físicas ajustáveis de acordo com a aplicação e fundamentais na ET (WANG; CHEN; CHEN, 2017), além disso os *scaffolds* (suportes porosos) podem permitir a entrega de células ao corpo de forma minimamente invasiva ou o desenvolvimento de matrizes para o encapsulamento celular e para suportes 3D (*bioprinting*) (REAKASAME; BOCCACCINI, 2018).

1.2 Hidrogéis na engenharia de tecidos

1.2.1 Hidrogéis injetáveis

Os hidrogéis injetáveis fazem parte de uma subclasse de hidrogel e que, de acordo com a *Encyclopedia of Nanotechnology* (2012), se baseiam na ideia de o biomaterial poder ser injetado como líquido, e em seguida formar um gel sólido *in situ*. A solução precursora do hidrogel pode ser introduzida de maneira minimamente invasiva, direto no local de interesse, diminuindo significativamente o desconforto do paciente, risco de infecção, tempo de recuperação e custo do tratamento. Essa proposta é interessante, visto que agentes terapêuticos, como fármacos, proteínas, células, nanopartículas ou outras biomoléculas podem ser incorporados nas soluções poliméricas precursoras antes da injeção e posteriormente retidos na rede do hidrogel (PULICKAL *et al.*, 2018). A Figura 1 mostra o esquema utilizando os hidrogéis injetáveis que agem na regeneração do tecido ósseo.

Figura 1 – Esquema para aplicação de hidrogéis injetáveis na regeneração do tecido ósseo



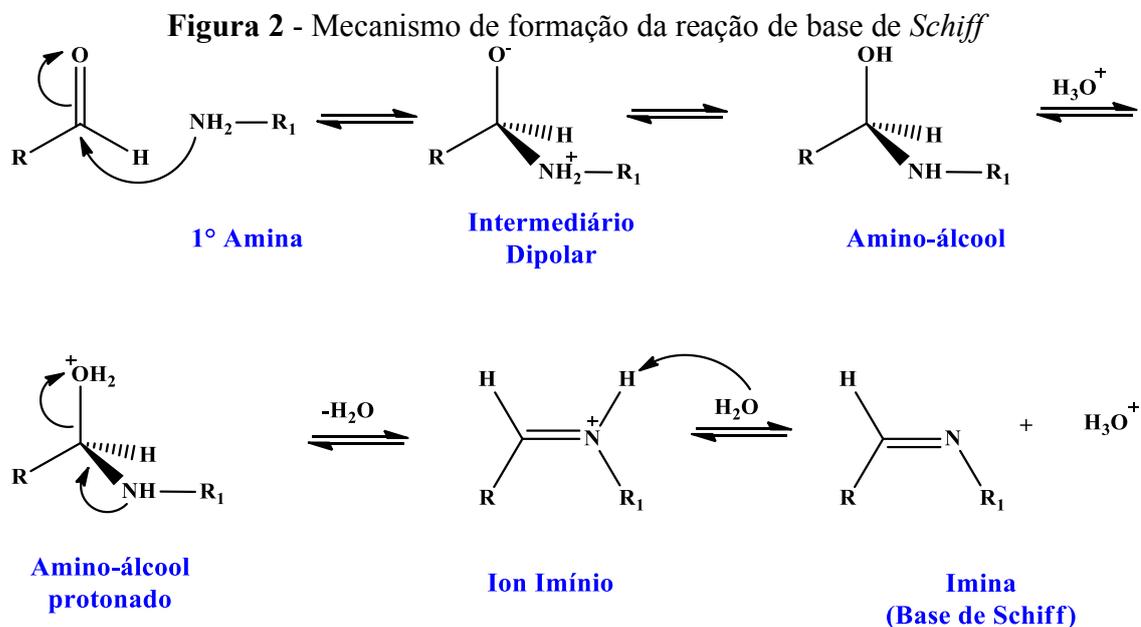
Fonte: próprio autor.

Uma vez injetado, a formação do hidrogel pode ocorrer através de reticulação física, que emprega associações não covalentes entre as cadeias dos polímeros (forças

eletrostáticas, interações hidrofóbicas, ligação de hidrogênio), ou por reticulação química que são obtidas mediante formação de uma ligação covalente entre os grupos funcionais das cadeias poliméricas (foto-irradiação, adição de Michael, reações click, oximas, reações mediadas por enzimas e a base de *Schiff*) (CHAO *et al.*, 2019; HU; WANG; XIAO, 2019).

1.2.2 Hidrogéis via formação de base de *Schiff*

A reação de base de *Schiff* tem sido bastante utilizada para sintetizar novos materiais como hidrogéis injetáveis e suportes porosos para aplicação na engenharia de tecidos (MACIEL *et al.*, 2019; JUNPENG; YI, 2019). A ligação imina é obtida através da reação entre compostos carbonílicos (aldeídos e cetonas) com grupos amino (amina primária) (XIN; YUAN, 2012) (Figura 2). Essa reação tem ganhado grande relevância, pois ela se processa sob circunstâncias moderadas (condições ambientes, pH do meio fisiológico), tendo exclusivamente água como subproduto (JIA; LI, 2015; LI *et al.*, 2015a, 2015c). Além disso, a utilização dessa reação como agente macro reticulante na produção dos *scaffolds* evita a necessidade de utilizar agentes reticulantes tóxicos como o glutaraldeído e a carbodiimida, os quais podem acabar causando uma resposta indesejada para o tecido a ser regenerado (KHUNMANEE; JEONG; PARK, 2017). Uma outra vantagem é sua rápida reticulação e sua excelente biocompatibilidade (HOZUMI *et al.*, 2018).



Fonte: próprio autor.

Os hidrogéis injetáveis que são obtidos através dessa reação exibem uma reversibilidade com a mudança de pH, consequentemente a estabilidade desses materiais diminui à medida que o pH da solução decresce, favorecendo a degradação do material com o tempo (XIN; YUAN, 2012). Essas propriedades 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, tais como: quitosana (RICCARDO *et al.*, 2022), gelatina e ácido hialurônico (HOZUMI *et al.*, 2018), alginato de sódio (OH *et al.*, 2021), dextrana (SU *et al.*, 2021), dentre outros. Essa reação também é utilizada em diversos campos de aplicação que visa produzir novos materiais para potencializar a atividade microbiana de polímeros naturais como quitosana (HASSAN *et al.*, 2018), liberar controladamente fármacos (IRAJI *et al.*, 2022), regenerar tecidos (MALIK *et al.*, 2022) e auxiliar na formação de complexos metálicos (KADWA; FRIEDRICH; BALA, 2017).

Os hidrogéis injetáveis podem ser preparados a partir de polímeros naturais e sintéticos, ou pela combinação destes (PULICKAL *et al.*, 2018). 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 (LI *et al.*, 2018b).

Os polissacarídeos são bastante utilizados principalmente na construção de suportes porosos que são aplicados na substituição ou regeneração de vários tipos de tecidos (cartilagem, osso, menisco, ligamentos, discos intervertebrais, entre outros). Eles apresentam alta biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesão, bioatividade e possuem certa semelhança estrutural com os componentes da matriz extracelular, propiciando maior proliferação e diferenciação celular (RADHAKRISHNAN; SUBRAMANIAN; KRISHNAN; SETHURAMAN, 2016). Além do mais, esses polissacarídeos apresentam grande quantidade e variedade de grupos funcionais em sua estrutura (-OH, -NH₂, -COOH, etc), que são susceptíveis a vários tipos de modificações químicas, conferindo-lhes a oportunidade de introduzir porções reticuláveis ou moléculas bioativas (SIVASHANMUGAM *et al.*, 2015).

1.3 Galactomananas e derivados oxidados

Galactomananas são polissacarídeos neutros, extraídos do endosperma de sementes da família *Leguminosae* e de fontes microbianas, em particular, de leveduras e outros fungos (YU *et al.*, 2022). Estruturalmente, são constituídas por uma cadeia principal de D-manopiranosose (M) unidas por ligações glicosídicas β -(1→4) e resíduos de D-galactopiranosose (G) ligados à cadeia principal por ligações glicosídicas α -(1→6) (DEA; MORRISON, 1975).

As galactomananas diferem entre si pela razão M:G, massa molar e distribuição estatística das unidades de galactose, de acordo com sua origem botânica (SAHA *et al.*, 2017). A solubilidade em água, viscosidade e interação das galactomananas com outros polissacarídeos são influenciadas consideravelmente por variações na razão M:G (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

Dentre as galactomananas de maior importância comercial destacam-se: a goma tara (*Caesalpinia spinosa*), goma alfarroba (*Ceratonia siliqua*) e a goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) (SINGH; SINGH; ARYA, 2018).

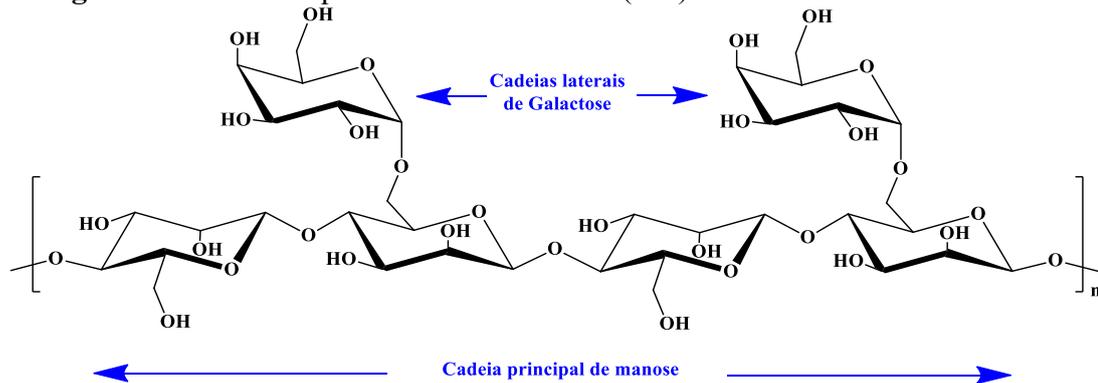
A goma guar (GG) é obtida de sementes da *Cyamopsis tetragonolobus*, um membro da família *Leguminosae*, sendo bastante utilizada em vários campos de aplicação, como na indústria de alimentos, têxtil, cosméticos, farmacêutica, entre outras (GEORGE; SHAH; SHRIVASTAV, 2019).

Esta planta é cultivada principalmente no oeste da Índia e no leste do Paquistão, e em menor extensão em áreas tropicais, como América do Sul e Central, África, Austrália e em regiões semiáridas do sudoeste dos EUA (SHARMA *et al.*, 2018).

O endosperma, obtido pelas técnicas usuais de purificação comercial, não é completamente puro. Traços de casca e embrião deixados no endosperma contribuem para as impurezas. A goma guar compreende 75-86% de endosperma, 8-14% de umidade, 5-6% de proteína, 2-3% de fibra e 0,5-1% de cinzas (THOMBARE *et al.*, 2016).

A razão M:G da GG é bastante citada como sendo 2:1 (Figura 3). Contudo, várias pesquisas indicam que esta razão pode variar de 1,6:1 a 1,8:1. O maior número de cadeias laterais (unidades de galactose) é responsável pela sua elevada solubilidade em água (SHARMA *et al.*, 2018).

Figura 3 - Estrutura química da Goma Guar (GG) com razão molar M:G de 2:1

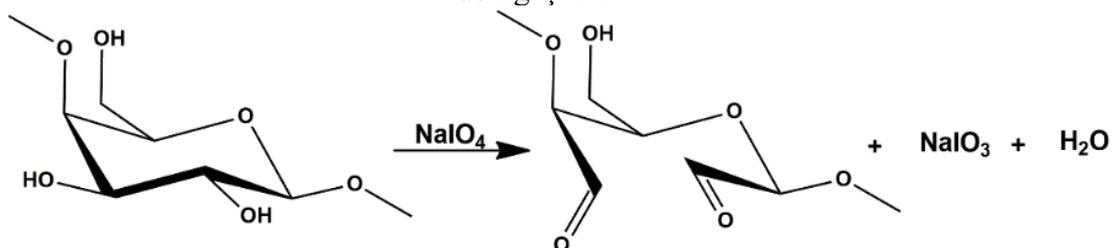


Fonte: próprio autor.

Vários derivados de goma guar são reportados na literatura, tais como: carboximetil goma guar (DALEI, 2022), hidroxipropil goma guar (YIN *et al.*, 2018), goma guar oxidada com TEMPO (CASTRO *et al.*, 2016), goma guar sulfatada (KAZACHENKO *et al.*, 2021) e goma guar oxidada com periodato de sódio (YU *et al.*, 2022), entre outros.

A funcionalização por oxidação com periodato de sódio é relatada na literatura para vários polissacarídeos, como por exemplo: amido (XU *et al.*, 2022), celulose (CAPÁKOVÁ *et al.*, 2019; MISHRA *et al.*, 2019), pululana (SELVAKUMAR; LONCHIN, 2022), dextrana (CHEN *et al.*, 2022), alginato (GUO; WANG, 2022), entre outros. Essa reação representa um método simples para introduzir grupos aldeído em polissacarídeos mediante oxidação seletiva de dióis vicinais (Figura 4) (REAKASAME; BOCCACCINI, 2018). A GG se torna uma potencial candidata para oxidação utilizando periodato de sódio, uma vez que sua cadeia principal e lateral possuem hidroxilas vicinais. A introdução de grupos aldeído na GG permite que esse polissacarídeo possa atuar como um agente macro reticulante para outros biopolímeros ricos em grupos amino, como é o exemplo da quitosana, via reação de base de *Schiff*.

Figura 4 – Seletividade da reação do periodato em uma unidade de galactose com padrão de ligação 1→4

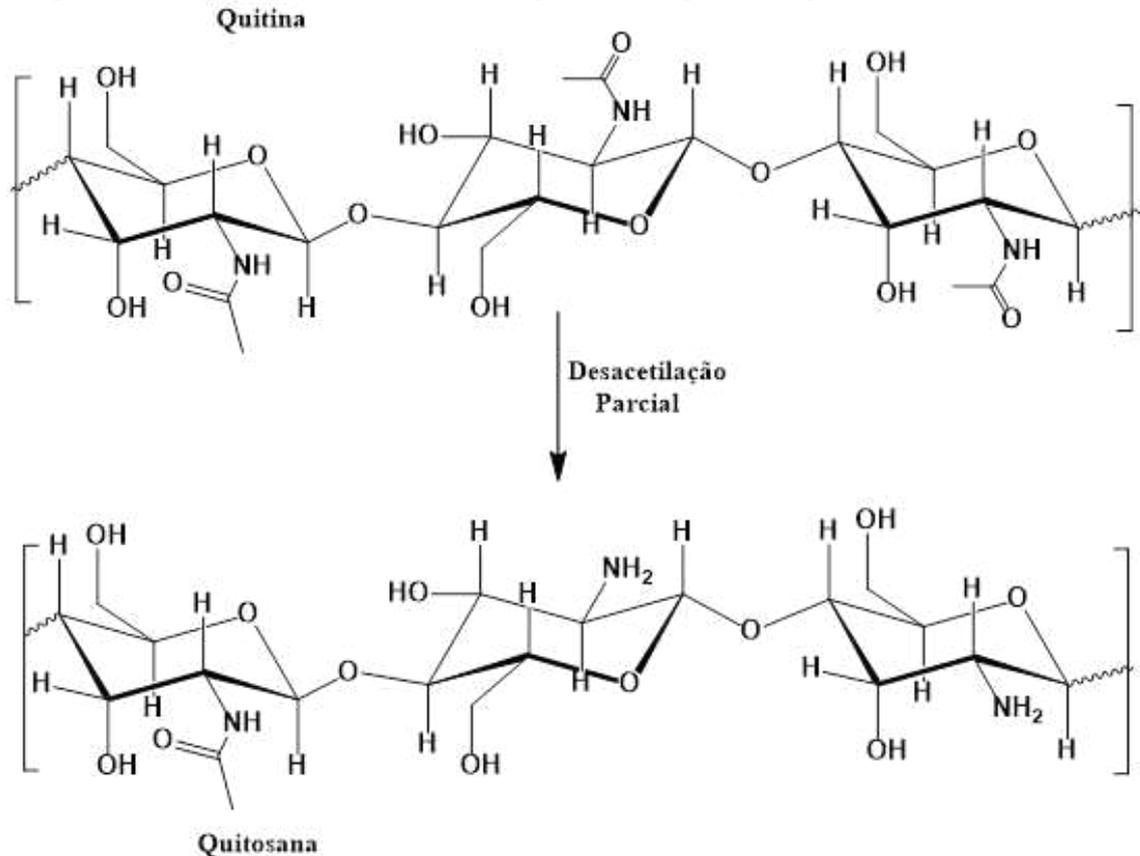


Fonte: próprio autor.

1.4 Quitosana e Carboxietilquitosana

A Quitosana (QT) é um copolímero de unidades N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) e disponível em diferentes graus de desacetilação (Figura 5) (MUZZARELLI, 1973).

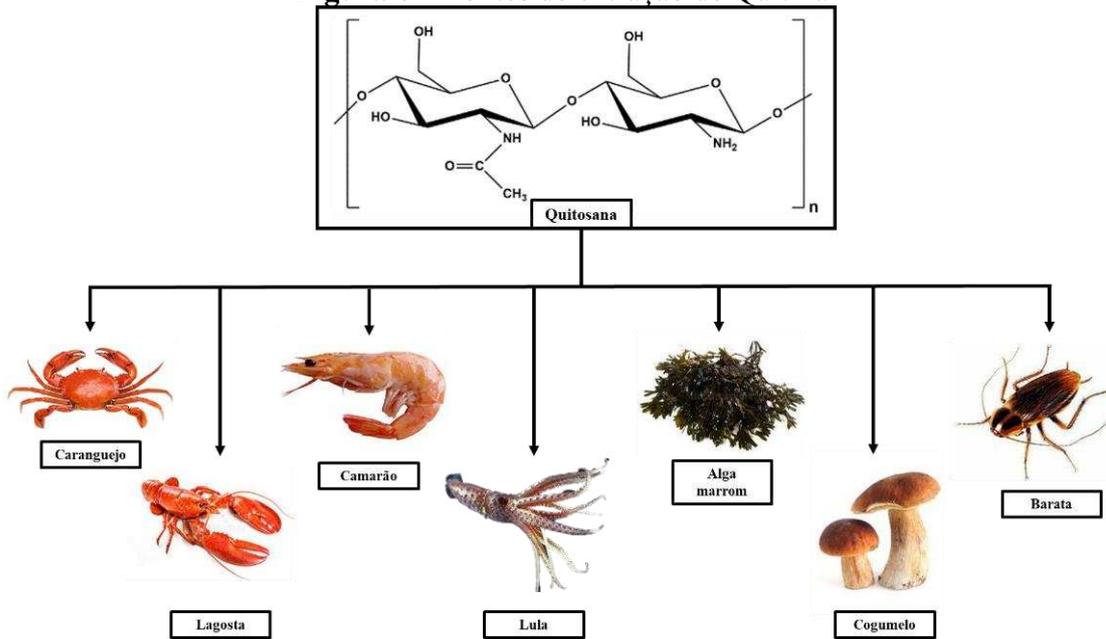
Figura 5 – Representação da estrutura química da quitosana parcialmente desacetilada



Fonte: próprio autor.

A quitosana é obtida através da desacetilação parcial alcalina da quitina, que é o composto principal encontrado nos exoesqueletos de insetos e carapaças de crustáceos, como o camarão e lagostas (Figura 6). A QT é um excelente material para aplicações biomédicas, devido principalmente a suas propriedades como biocompatibilidade, não toxicidade, biodegradabilidade, baixa imunogenicidade e fácil disponibilidade (PRADHAN *et al.*, 2019).

Figura 6 – Fontes de extração de Quitina



Fonte: próprio autor.

Contudo, a quitina tem aplicações limitadas, devido sua baixa solubilidade em água e solventes orgânicos. Em contraste, a quitosana apresenta uma maior versatilidade devido à sua solubilidade em meio ácido ($\text{pH} < 6,0$) (PRADHAN *et al.*, 2019). O mecanismo de solubilização da quitosana envolve a protonação dos grupos amino nas unidades glucosamina. Entretanto, quando se trata de aplicações biomédicas, é necessário que a quitosana seja solúvel em pH do meio fisiológico (7,4). Isto pode ser conseguido através da modificação de sua estrutura pela inserção ou formação de grupos hidrofílicos (PRADHAN *et al.*, 2019).

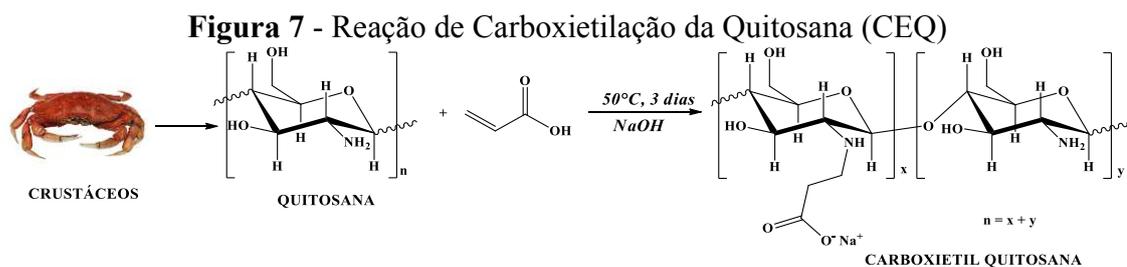
Inmaculada *et al.* (2021) conduziram uma revisão bibliográfica na qual destacaram diversas metodologias disponíveis para a produção de derivados solúveis em solução aquosa a partir da quitina e quitosana. As modificações mencionadas neste estudo são viáveis devido à natureza nucleofílica do nitrogênio presente na amina e do oxigênio nas hidroxilas, permitindo a reação com reagentes que possuem regiões eletrofílicas, como ácido glioxílico, ácido monocloroacético, ácido levulínico, entre outros.

Cresce incessantemente a procura por variantes de quitosana que apresentem solubilidade em água, expandindo as perspectivas de novas aplicações desse polissacarídeo no campo dos biomateriais. Diversas pesquisas têm sido divulgadas, empregando o mecanismo de adição de Michael, com destaque para o uso de solventes como metacrilato (MICHAEL *et al.*, 2022), acrilato de etila (ABEER, 2022) e ácido monocloroacético (GAO *et al.*, 2022). No entanto, é válido observar que tais reações frequentemente empregam solventes orgânicos,

incluindo ácido acético e metanol. Adicionalmente, a saponificação do grupo éster é essencial para obter derivados de quitosana solúveis em água.

Nesse contexto, o objetivo central deste trabalho é empregar a reação do ácido acrílico em interação direta com a quitosana, através do mecanismo de adição de Michael, com a finalidade de reduzir a potencial toxicidade do derivado, resultando em uma síntese menos agressiva (síntese verde). A carboxietilação demonstra ser um método viável para tornar a quitosana solúvel numa ampla faixa de pH, sem alterar as demais propriedades em grandes proporções.

A reação de síntese da carboxietilquitosana (CEQ) 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 acceptor de Michael (eletrófilo). Após a reação entre a quitosana e o ácido acrílico (Figura 7) 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 (QU *et al.*, 2017), esse derivado pode ser utilizado para produzir hidrogéis injetáveis pela reação de reticulação com grupos aldeído de polissacarídeos oxidados.



Fonte: próprio autor.

Nessa perspectiva, os hidrogéis injetáveis sintetizados a partir da goma guar oxidada (GGOx) em periodato de sódio e carboxietilquitosana (CEQ) podem ser obtidos via reticulação por formação de base de *Schiff*.

Apesar do crescente uso dos polissacarídeos para a produção de hidrogéis injetáveis na medicina regenerativa, essa classe de polímeros ainda encontra algumas limitações que afetam a sua aplicabilidade, como uma baixa resistência mecânica (baixo módulo de elasticidade ou módulo de armazenamento, G') (GUAN *et al.*, 2017). Essa dificuldade acaba diminuindo a sua aplicabilidade na engenharia de tecidos quando é requerido uma alta resistência mecânica, como em tecidos ósseos e tendões.

Uma das possibilidades para contornar essas limitações é a incorporação de agentes de reforços na matriz dos hidrogéis (LIU *et al.*, 2018). Vários agentes de reforços são relatados na literatura, sendo provenientes de origem orgânica, como os *nanowhiskers* de quitina (STOYANOV, 2022) e celulose (LIU *et al.*, 2018) e os de origem inorgânica, como as nanopartículas de sílica (ALI; HASAN; SINGH, 2022), hidroxiapatita (ANAYO *et al.*, 2021) e o vidro bioativo (CHATTRAIRAT *et al.*, 2022).

1.5 Vidro Bioativo

O vidro bioativo (VB) foi desenvolvido por Larry Hench e colaboradores em 1969 e, desde então, vem sendo estudado para diversas aplicações na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa, especialmente na engenharia de tecido ósseo (CHEISY *et al.*, 2016). Isso é devido principalmente às propriedades como: excelente osteocondutividade, biodegradabilidade controlável, aumento das propriedades dos polímeros (em particular bioatividade e propriedades mecânicas) (VUKAJLOVIC *et al.*, 2019) e, principalmente, a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) na superfície do implante. Essa camada tem uma composição semelhante ao tecido ósseo e é a principal responsável pela formação de uma ligação efetiva entre o material e o tecido (HENCH, 1973). Essas reações ocorrem na interface entre biomaterial/tecido e podem ser resumidas em cinco estágios representados na Figura 8.

1. Troca iônica de Na^+ e/ou Ca^{2+} pertencentes ao vidro por H^+ e H_3O^+ do fluido corporal.
2. Perda de sílica solúvel do material na forma de $\text{Si}(\text{OH})_4$ para a solução e formação da camada de silanol (Si-OH).

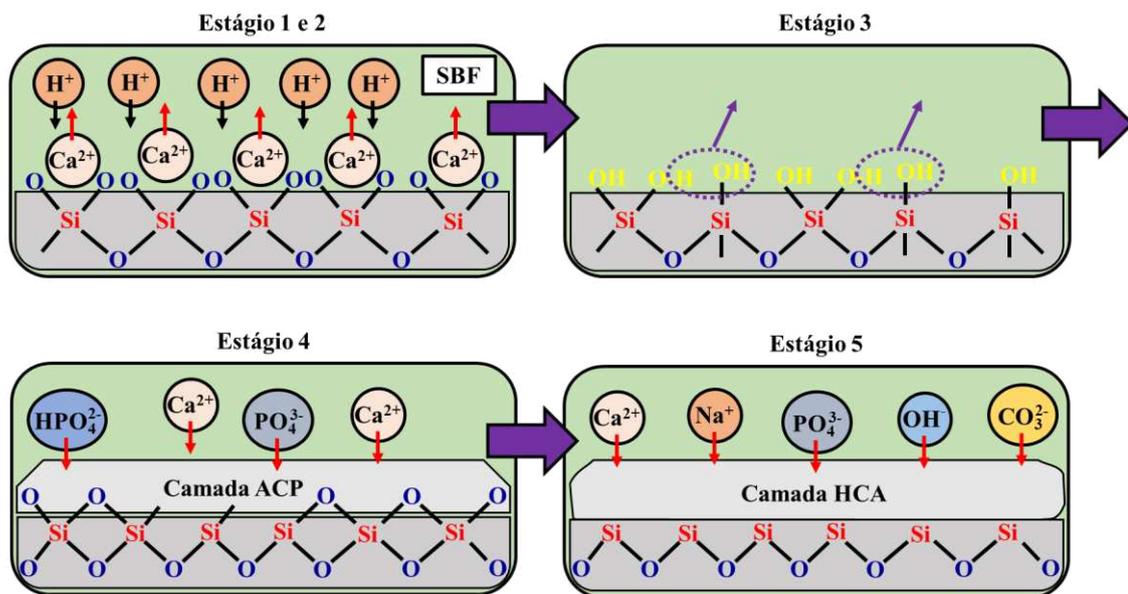


3. Policondensação da camada rica em SiO_2 na superfície do material.



4. Migração dos grupos Ca^{2+} e PO_4^{3-} para a superfície através da camada rica em sílica e posterior crescimento da camada rica em $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ pela incorporação do Ca^{2+} e PO_4^{3-} da solução.
5. Cristalização da camada amorfa de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ (ACP) pela incorporação de OH^- e CO_3^{2-} provenientes da solução, originando a camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA).

Figura 8 – Ilustração esquemática da sequência de reações que levam a formação de HCA em SBF



Fonte: próprio autor.

Os VB formados por silicatos, como o 45S5 (Bioglass[®]), tem composição molar de 46,1% SiO_2 , 24,4 % Na_2O , 26,9% CaO , 2,6% P_2O_5 e são os mais utilizados na regeneração de tecido ósseo, pois essa cerâmica consegue liberar e trocar os íons de Si, Na, Ca e P com a matriz óssea, acarretando uma maior resposta extra e intracelular e promovendo, assim, uma rápida formação desse tecido (HASAN *et al.*, 2019).

Os VB podem ser produzidos por diferentes rotas, destacando principalmente o método convencional, no qual as partículas podem ser sintetizadas pelo método de fusão (utilização de temperaturas elevadas, 1300 °C). Contudo, nos últimos anos, a técnica de síntese por sol-gel tem ganhado bastante destaque, pois possibilita a produção de um vidro mais bioativo, devido principalmente a um maior controle dos parâmetros de síntese e do produto (composição e característica dos materiais) (FARANO *et al.*, 2018).

O método sol-gel tem várias vantagens comparadas ao método convencional, tais como: obtenção de VB apresentando bioatividade para até 100% de SiO_2 , fácil obtenção e

produção de pó, alta osteocondutividade, uso de menores temperaturas (variando da temperatura ambiente à 600-700 °C), obtenção de vidro com uma maior área superficial e uma maior degradabilidade.

Além disso, esse método produz VB em escala nanométricas, que são mais efetivas comparada às produzidas em escala micrométricas. Os nanométricos possuem uma maior área superficial, apresentam uma maior adsorção de proteínas e, conseqüentemente, acabam apresentando uma maior bioatividade (OWENS *et al.*, 2016).

Como mostrado na Tabela 1, os VB estão entre os materiais que apresentam os maiores valores de resistência à fratura e um maior contato com tecido ósseo (contato no qual se dá entre a camada de hidroxiapatita formada e o tecido ósseo aplicado), sendo assim um potencial agente de reforço para matrizes poliméricas na formação e regeneração do tecido ósseo.

Tabela 1 – Resistência e contato da camada de ligação de biomateriais

Materiais	Resistência à fratura na interface (MPa)	Contato com tecido ósseo (%)
Vidro Bioativo (Bioglass [®])	28,9	93
Hidroxiapatita	19,6	91
Titânio	1,9	60
Zircônia	1,3	33

Fonte: adaptado de Biomateriais, Fundamentos e Aplicações, 1ed. (2012).

Na Tabela 2 é mostrado um resumo de requisitos básicos que são necessários para se obter sucesso na aplicação da regeneração do tecido ósseo.

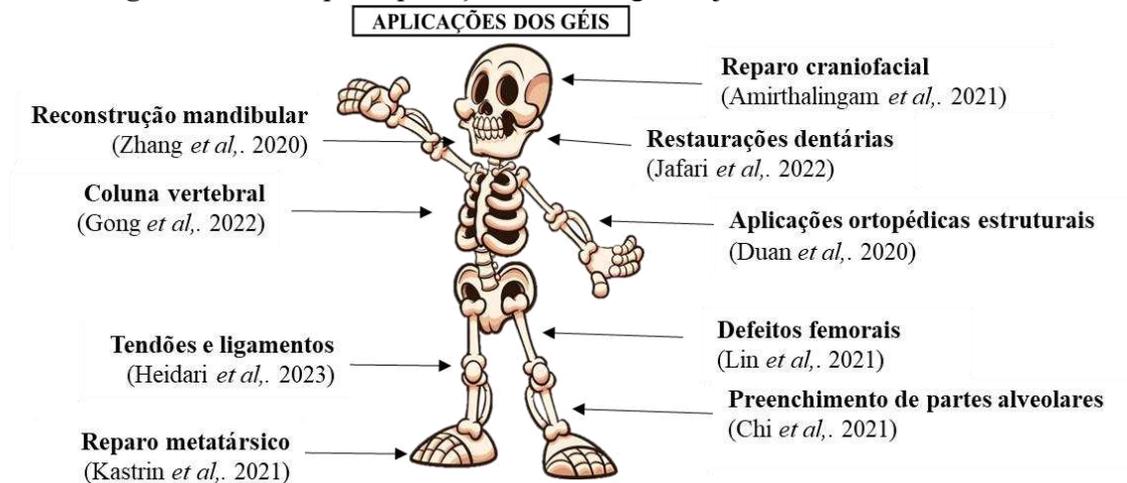
Tabela 2 – Requisitos básicos para um *scaffolds* ideal na engenharia de tecido ósseo

Requisitos Biológicos	Requisitos Mecânicos	Requisitos Estruturais
Biodegradável	Propriedades mecânicas	Poros Interconectados
Biocompatível	Módulo de compressão (2-12 MPa)	Tamanho médio dos poros (100 a 300 µm)
Não tóxico e osteogênico	Módulo Young (0,05-0,5 MPa)	Nano topografia

Fonte: adaptado de Witte *et al.* (2018).

Os vidros bioativos são cada vez mais utilizados na medicina regenerativa. Na Figura 9 são evidenciados alguns trabalhos publicados, nos quais há a utilização de polissacarídeos com vidro bioativo incorporados na matriz polimérica para preparação de hidrogéis injetáveis usados na regeneração de tecidos ósseos.

Figura 9 – Principais aplicações de hidrogéis injetáveis em tecido ósseo



Fonte: próprio autor.

A reconstrução maxilar é um procedimento crucial para restaurar a função e estética em pacientes com perda óssea significativa. Uma abordagem inovadora nesse contexto envolve o uso de hidrogéis injetáveis contendo bioglass, uma cerâmica bioativa. Esses hidrogéis oferecem uma matriz tridimensional flexível que pode ser facilmente moldada no local da lesão, proporcionando suporte estrutural e promovendo a regeneração óssea (GUO *et al.*, 2023). O bioglass, composto por silicato de cálcio, fósforo e sódio, demonstra propriedades bioativas que estimulam a formação de novo tecido ósseo. A aplicação desses materiais injetáveis oferece uma alternativa minimamente invasiva em comparação com métodos tradicionais, reduzindo o tempo de recuperação e riscos associados. A capacidade de promover a osteogênese torna os hidrogéis com bioglass uma opção promissora para procedimentos de reconstrução maxilar, representando avanços significativos na área de odontologia e cirurgia maxilofacial (MEHROTRA *et al.*, 2020).

Diante deste contexto, esse trabalho pretende preparar hidrogéis injetáveis baseados em goma guar oxidada e carboxietilquitosana por reticulação, via reação de base de Schiff, usando nanopartículas de vidro bioativo como agente de reforço, visando à aplicação desses sistemas na engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Preparar e caracterizar uma matriz injetável formada por um compósito à base de goma guar oxidada e carboxietilquitosana reforçadas com nanopartículas de vidro bioativo com potencial utilização na engenharia de tecido.

2.2 Objetivos específicos

Despolimerizar a goma guar comercial através da hidrólise ácida em diferentes tempos de reação (1, 2, 3, 6, 10 h).

Caracterizar a goma guar e a goma guar despolimerizada por cromatografia de permeação em gel (GPC) e viscosidade complexa determinada por reologia.

Modificar a goma guar despolimerizada por reação de oxidação com periodato de sódio com o intuito de se obter três graus de oxidação (30, 50 e 70%) e caracterizar os derivados oxidados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), cromatografia de permeação em gel (GPC) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H).

Modificar quimicamente a quitosana para se obter derivados hidrossolúveis através da reação de adição de Michael, obtendo-se a carboxietilquitosana (CEQ) e caracterizá-los por FTIR e RMN ¹H.

Obter nanopartículas de vidro bioativo a partir da rota sol-gel e caracterizá-las através de medidas de potencial zeta (Pζ), espalhamento dinâmico de Luz (DLS), difração de raios X (DRX), FTIR, propriedades texturais (BET), composição química da estrutura por ICP-OES, morfologia, topografia e distribuição por tamanho de partícula (MEV e AFM).

Preparar hidrogéis a partir de goma guar oxidada e carboxietilquitosana por reticulação via formação de base de *Schiff*, usando nanopartículas de vidro bioativo como agente de reforço da matriz.

Avaliar a influência do grau de oxidação da goma guar e do teor de nanopartículas de vidro bioativo sobre o tempo de geleificação.

Caracterizar os hidrogéis por FTIR, tempo de gelificação, propriedades mecânicas, injetabilidade, seringabilidade, porosidade, tamanho de poros, degradação, intumescimento.

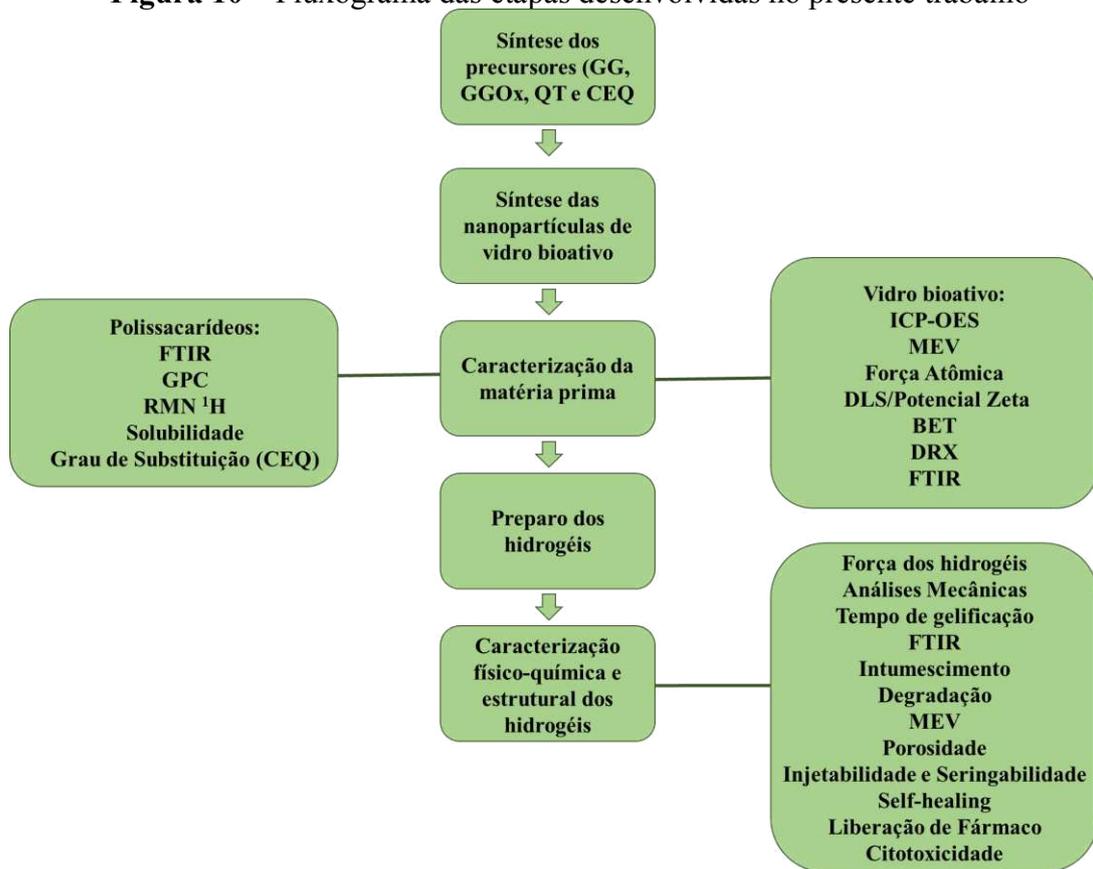
Estudar a cinética de liberação do fármaco (tetraciclina) nos hidrogéis como também sua citotoxicidade *in vitro*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Etapas de desenvolvimento do trabalho

O fluxograma apresentado na Figura 10 descreve as principais etapas que foram desenvolvidas neste trabalho.

Figura 10 – Fluxograma das etapas desenvolvidas no presente trabalho



Fonte: próprio autor.

3.2 Materiais

Os solventes utilizados foram: metanol (CH₃OH), ácido nítrico (HNO₃), solução 33% de hidróxido de amônio (NH₄OH). Os reagentes empregados foram: tetraetil ortosilicato 98% (TEOS) (Sigma-Aldrich), nitrato de cálcio tetraidratado (Ca(NO₃)₂.4H₂O), trietil fosfato 99% (TEP) (Sigma-Aldrich), periodato de sódio (NaIO₄) (Dinâmica), cloridrato de hidroxilamina (NH₂OH.HCl) (Dinâmica), etileno glicol (CH₂OHCH₂OH), goma guar (Sigma) e quitosana com grau de desacetilação de 75% (Polymar).

3.3 Purificação da goma guar (GGP)

Para remoção de eventuais impurezas encontradas no polissacarídeo, a goma guar passou por uma etapa de reprecipitação como descrito no procedimento a seguir: inicialmente pesou-se 10,0 g da goma guar comercial e dissolveu-se em 1 L de água destilada sob agitação mecânica (250 rpm) por 48 h. Logo após, a solução foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi recolhido e, em seguida, lentamente precipitado em álcool etílico comercial 96% na proporção de 1:2 (volume de solução de goma/volume de álcool). O precipitado de goma guar obtido foi coletado em funil de placa sinterizada (G4), lavado três vezes com etanol e acetona P.A e seco contra jato de ar quente.

3.3.1 Despolimerização da goma guar (GGD)

A GGP foi despolimerizada de acordo com a metodologia descrita por Li *et al.* (2018), com pequenas modificações. Inicialmente, em um balão de fundo redondo, adicionou-se 15 mL de etanol (PA) e 0,2 mL de ácido clorídrico 36% (m/v). A solução foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 10 min para uma completa dissolução. Posteriormente, adicionou-se 7,5 g de GGP na reação (em um sistema fechado) a 75 °C sob agitação magnética. A reação foi deixada por diferentes tempos de degradação (1, 2, 3, 6, 10 h) com o intuito de analisar a melhor condição a ser utilizada no trabalho. Em seguida, o balão foi mantido à temperatura ambiente para resfriamento e posterior neutralização com NaOH 1 mol L⁻¹. O produto foi isolado através de centrifugação a 6000 rpm por 10 min. O precipitado foi lavado em funil de placa sinterizada (G4) utilizando etanol 80% (v/v). A finalização da reação foi notada pela condutância do solvente de lavagem (2 µS cm⁻¹). A goma guar despolimerizada (GGD) foi seca em estufa na temperatura de 60 °C por 60 min.

3.3.2 Solubilidade e reologia de fluxo

A solubilidade das amostras de GGP e GGD foi determinada utilizando a metodologia de Betancur-Ancona; López-Luna; Chel-Guerrero (2003), com pequenas adaptações. Soluções de 30 mL da goma guar purificada e despolimerizada foram preparadas em uma concentração de 10 mg mL⁻¹ através de agitação magnética (25 °C, 1 h). As suspensões formadas foram centrifugadas (6000 rpm, 15 min). Logo após, 10 mL dos sobrenadantes foram

postos em placas de petri e secos em estufa de circulação de ar até que um peso constante fosse obtido (105 °C, 24 h). A solubilidade foi calculada usando a Equação 1.

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{ms \times 3}{300} \times 100 \quad (1)$$

onde: *ms* é a massa em mg obtida após secagem de 10 mL dos sobrenadantes. O fator 300 é a massa inicial em mg das amostras.

A viscosidade das amostras de GGP e GGD foi analisada através das propriedades reológicas obtidas no reômetro AR-550 da TA instruments, operando na faixa da taxa de cisalhamento de 0,1 a 1000 s⁻¹ (25 °C), com geometria cone placa de 40 mm de diâmetro. As amostras foram dissolvidas em água destilada na concentração de 10 mg mL⁻¹.

3.4 Oxidação da goma guar e determinação do grau de oxidação

A goma guar despolimerizada (GGD) foi oxidada de acordo com a metodologia descrita por Gomez; Rinaudo; Villar (2007), com pequenas modificações. Brevemente, 1 g (6,2 x 10⁻³ mol de unidades monossacarídicas) de GGD (1 h de reação, escolhido dentre os diferentes tempos na seção 3.3.1) foi dissolvida em 100 mL de água destilada e a solução foi agitada por 24 h para uma completa dissolução. A esta solução foi adicionado periodato de sódio, que foi suficiente para oxidar 30, 50 e 70% das unidades monossacarídicas.

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, o etilenoglicol foi adicionado ao meio reacional em quantidade equimolar em relação ao NaIO₄ para cessar a reação. A goma guar oxidada (GGOx) obtida foi dialisada contra água destilada por 3-4 dias em membrana de celulose com limite de exclusão de 14.000 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. Por fim, foram obtidos os derivados com graus de oxidação teóricos de 30, 50 e 70%, sendo nomeados GGOx 30, GGOx 50 e GGOx 70, respectivamente.

O teor de aldeído foi determinado após a reação do polissacarídeo oxidado com uma solução de cloridrato de hidroxilamina. O ácido clorídrico liberado após a conversão de aldeídos em oximas foi seguido de titulação potenciométrica com NaOH (ZHAO; HEINDEL, 1991). O grau de oxidação foi calculado através da Equação 2.

$$GO (\%) = \frac{0,162 \times V \times C}{2 m} \times 100 \quad (2)$$

Em que: V, C, e m correspondem ao volume da solução de NaOH consumido no ponto de equivalência (mL), concentração da solução de NaOH (mol L⁻¹) e massa de goma guar oxidada (g), respectivamente. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

3.5 Purificação da quitosana (QT)

A purificação da quitosana foi realizada seguindo a metodologia descrita por Nasti *et al.* (2009), com algumas modificações. Inicialmente, 5 g de quitosana foram dissolvidas em 500 mL de ácido acético 2% (v/v), e deixada sob agitação por 24 h para uma completa dissolução. Posteriormente, a solução foi filtrada em funil de placa sinterizada (G3) para remoção de impurezas e, em seguida, fervida por 30 min em banho de areia. Após fervura, a solução foi centrifugada por 30 min à 6000 rpm. O sobrenadante foi coletado e o pH ajustado para 9,0 com NaOH 1,0 mol L⁻¹, com a finalidade de precipitar a 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 em dessecador para posterior utilização.

3.6 Síntese da N-carboxietilquitosana (CEQ)

Os derivados hidrossolúveis de quitosana foram sintetizados via reação de adição de Michael, segundo metodologia descrita por Qu *et al.* (2017). Primeiramente, 1,0 g de quitosana purificada foi dissolvida em 50 mL de água destilada contendo 1,46 mL de ácido acrílico (AA) 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 para conversão de -COOH em sal de sódio. Finalmente, a solução foi precipitada em etanol comercial e o sólido lavado três vezes com acetona e etanol PA e seco em estufa.

O efeito do ácido acrílico (0,04-0,16 mol) para concentração de quitosana (0,04 mol), temperatura da reação (25-100 °C) e o tempo de reação (1-4 dias) foram estudados para otimizar as condições da reação da carboxietilquitosana (CEQ) para obtenção do derivado hidrossolúvel com o menor grau de substituição e com mais grupos aminos disponíveis para posterior utilização na reação de base de *Schiff*.

O grau de substituição (GS) da CEQ foi determinado a partir do RMN ¹H (500 MHz, D₂O) pela Equação 3.

$$GS (\%) = (1 - GD) \times \frac{3}{2} \times \frac{A_{2,53}}{A_{2,03}} \times 100 \quad (3)$$

onde: GD é o grau de desacetilação da quitosana (75% determinado por RMN ^1H) e os valores de 2,03 (singlete, 3H, COCH_3) e 2,53 (singlete, 2H, CH_2COONa).

3.7 Caracterização da goma guar e seus derivados, quitosana e carboxietilquitosana

3.7.1 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

O volume de eluição (V_e) e a massa molar de pico (M_{pk}) da goma guar despolimerizada (em diferentes tempos de degradação ácida) e de seus derivados oxidados foram determinados por cromatografia de permeação em gel através de um equipamento Shimadzu acoplado a um detector de índice de refração (RID-6A). A fase móvel utilizada foi nitrato de sódio (NaNO_3) 0,1 mol L^{-1} , à temperatura ambiente e fluxo de 1 mL min^{-1} .

3.7.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A avaliação dos grupos funcionais presentes na goma guar e nos seus derivados oxidados, quitosana e carboxietilquitosana foi realizada por meio de FTIR. Os materiais foram misturados em pastilhas de brometo de potássio (KBr) e os experimentos foram conduzidos em equipamento da Shimadzu modelo IR Tracer-100, operando numa faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 25 varreduras.

3.7.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos a 70 °C para GGP, GGD e espécies GGOx em água deuterada (D_2O) usando o espectrofotômetro Bruker Advance DPX300 com sonda de 5 mm. Os espectros de QT e CEQ foram obtidos a 25 °C em solução de ácido clorídrico deuterado (2% v/v, $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$) usando o espectrofotômetro Bruker Advance DRX500 com sonda de 10 mm. Os analitos foram dissolvidos na concentração de 25 mg mL^{-1} . Para todos os experimentos, 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) foi utilizado como padrão interno (0,00 ppm).

3.7.4 Determinação do grau de desacetilação da quitosana e grau de substituição da Carboxietilquitosana

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

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

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

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

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

$$GA (\%) = \frac{ACH_3}{3AH_2} \times 100 \quad (5)$$

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

3.7.5 Determinação da solubilidade em diferentes pH da carboxietilquitosana (CEQ) em meio aquoso

A solubilidade da CEQ preparada em diferentes pH foi determinada por medição da turbidez seguindo método descrito por Ding *et al.* (2012). Preparou-se uma solução aquosa de CEQ e QT purificada (2 mg mL⁻¹ ajustadas para o valor inicial de pH 1,5). Foi adicionado lentamente à solução inicial NaOH (1,0 mol L⁻¹) ou HCl (1,0 mol L⁻¹) para ajustar os valores de pH. A solubilidade das amostras foi avaliada pela transmitância de radiação visível em diferentes valores de pH em um espectrofotômetro SHIMADZU UV-1800 a 600 nm.

Foi realizado o teste de solubilidade em diferentes pH solubilizando a quitosana e seus derivados carboxietilados em soluções de HCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 1), água destilada (pH 5,5), tampão PBS (pH 7,4) simulando o meio fisiológico e NaOH 0,1 mol L⁻¹ (pH 14) a fim de ver o perfil macroscópico das soluções. As soluções foram preparadas nas concentrações de 2% (m/v).

3.8 Síntese das nanopartículas de vidro bioativo (VB)

A síntese das nanopartículas de vidro bioativo com composição nominal (em mol) de 80% de SiO₂, 16% CaO e 4% P₂O₅ foi realizada de acordo com metodologia descrita por Li *et al.* (2015). O método sol-gel foi modificado com a utilização do surfactante catiônico CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio), que age como template para a formação das partículas esféricas. Inicialmente, 4,6 mM (0,4073 g) de CTAB (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em 165 mL de água deionizada e 78 mL de álcool etílico absoluto 99,8% (Synth) com agitação magnética. Após a completa dissolução, foram adicionados, em sequência, com intervalo de 30 min e agitação magnética:

- 2,79 mL de Hidróxido de amônio, (27% NH₃, Synth);
- 3 mL de TEOS - Tetraetilortosilicato, (Sigma-Aldrich), como precursor de SiO₂;
- 0,230 mL de TEP - Trietil fosfato (Sigma-Aldrich), como precursor de P₂O₅,
- 0,64 g de Nitrato de cálcio tetrahidratado (Synth), como precursor de CaO;

A solução resultante foi agitada por mais 3 h, à temperatura ambiente, sendo possível observar a formação de um precipitado branco. Esse precipitado foi filtrado, lavado com etanol, água deionizada e seco à temperatura ambiente por 24 h. As amostras foram obtidas após a remoção do CTAB por calcinação a 650 °C por 3 h com rampa de temperatura de 2 °C/min (onde o vidro bioativo é adicionado na mufla em temperatura ambiente e após inicia-se o processo de calcinação), em seguida o VB produzido foi macerado em almofariz e pistilo de ágata.

3.9 Caracterização do vidro bioativo (VB)

3.9.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A avaliação dos grupos funcionais presentes no VB foi realizada por meio do FTIR. O material foi misturado em pastilhas de brometo de potássio (KBr) e os experimentos foram conduzidos em equipamento da Shimadzu modelo IR Tracer-100, operando numa faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 25 varreduras.

3.9.2 Composição química do vidro bioativo por ICP-OES

A composição química da amostra foi avaliada pelo método de fusão do metaborato de lítio e espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). Um total de 0,1 g da amostra a ser avaliada foi transferido para um cadinho de grafite contendo 0,7 g de metaborato de lítio anidro. Após essa etapa, mais 0,7 g de metaborato de lítio anidro foi transferido para o cadinho de grafite e foi então fundido a 950 °C por 10 min. O cadinho foi removido da mufla, a mistura homogeneizada e fundida mais uma vez a 950 °C por 10 min. Em seguida, a mistura foi transferida para um bequer contendo 100 mL de solução de 10% HNO_3 , mantida sobre agitação durante 20 min e a solução avaliada por ICP-OES. O equipamento Perkin-Elmer Optima 7300 DV ICP-OES foi utilizado para determinar as concentrações de Si, Ca, P das partículas obtidas e as razões de SiO_2 , CaO e P_2O_5 calculadas.

3.9.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das nanopartículas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura com equipamento Quanta - FEG FEI 450, operando com uma voltagem de aceleração de feixe de elétrons de 20 kV, equipado com Espectrômetro de Energia Dispersiva (EDS), para avaliar qualitativamente a composição química das amostras.

3.9.4 Microscopia de força atômica (AFM)

A topografia e a morfologia foram analisadas por AFM no equipamento XE-70 (Park Systems, Coreia do Sul), utilizando ponta de Si tipo 39 PPP-NCHR, no modo de não

contato, com força constante de 42 N/m e frequência 330 kHz. O preparo das partículas para análise foi realizado pela adição do material, na forma de pó, em álcool etílico na concentração 0,1 mg mL⁻¹. Após 30min em banho ultrassônico, uma gota da dispersão foi dispensada sob uma lamínula de mica para análise.

3.9.5 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O potencial zeta ($P\zeta$) e a distribuição do tamanho médio das partículas do VB foram determinadas por DLS usando o instrumento Nano Zeta Sizer Malvern, Modelo ZS 3600. O diâmetro hidrodinâmico foi medido por espalhamento de luz dinâmico com laser no comprimento de onda 633 nm e ângulo de espalhamento de 173° a 25 °C. Para isso, as partículas de VB foram dispersas em água e mantidas sob agitação por 24 h. Em seguida, a dispersão coloidal foi filtrada em membrana 0,45 µm (Millex LCR 25 mm, Millipore) e submetida à análise.

3.9.6 Propriedades texturais

Amostras foram desgaseificadas por 24 h a 200 °C previamente às análises. As isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio foram obtidas em equipamento Quanta Chrome NOVA 2200 ver. 6.11, à 77 K. A área superficial específica (SSA - specific surface area) foi determinada por método Brunauer-Emmett-Teller (BET) utilizando os pontos de adsorção com pressão relativa entre 0,01 e 0,30 enquanto o diâmetro e distribuição de poros foram calculados pelo método Barrett-Joyner-Halenda (BJH) aplicado às curvas de dessorção.

3.9.7 Difração de raio X (DRX)

A difração de raios X (DRX) das nanopartículas de vidro bioativo foi conduzida no equipamento X-Pert PRO MPD–Panalytical, com geometria Bragg-Bretano em modo contínuo, usando radiação Co K α ($\lambda = 0,1789 \text{ \AA}$) à 40 kV e 40 mA. O equipamento pertence ao Laboratório de Raios-X do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará (UFC). A análise foi conduzida nos materiais na forma de pó, com 2θ variando de 3,0° a 90,0° com passo de 0,013° e tempo de coleta de 1 s.

3.10 Preparação dos hidrogéis

Soluções de goma guar oxidada e carboxietilquitosana na concentração de 2% (m/v) foram preparadas usando água deionizada como solvente. As nanopartículas de vidro bioativo foram dispersas na solução de goma guar oxidada em diferentes razões mássicas $m_{VB}/m_{CEQ+GGOx}$ (1, 2, 5, 6, 10%) para escolha do gel com melhor propriedade mecânica.

Os hidrogéis foram preparados em placa de 48 poços a partir da mistura de volumes iguais de solução de carboxietilquitosana e goma guar oxidada/vidro bioativo. As nanopartículas de vidro bioativo (VB) na forma de pó foram adicionadas às formulações de modo a obter as seguintes concentrações finais: 0% (grupo controle, sem nanopartículas) e 5% ($m_{VB}/m_{CEQ+GGOx}$, com nanopartículas), essa percentagem de nanopartículas foi a condição escolhida com base em suas propriedades mecânicas.

Quando necessário para a realização de algumas análises (intumescimento, degradação, microscopia eletrônica de varredura, porosidade e citotoxicidade), os hidrogéis foram armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em um Ultra freezer da Nuair por 48 h e, por fim, liofilizados durante 48 h.

3.11 Caracterização dos hidrogéis

3.11.1 Análise mecânicas dos hidrogéis por análise reológica

Os hidrogéis foram preparados em solução aquosa de GGOx 30, 50 e 70% na concentração de 2% (m/v) e CEQ na concentração de 2% (m/v). Os hidrogéis foram misturados na razão 1:1 (v/

v) e então adicionou-se as nanopartículas de vidro na solução de GGOx variando a razão mássica de 1, 2, 5, 6, 10% ($m_{VB}/m_{CEQ+GGOx}$) com o intuito de se escolher o gel com maior propriedade mecânica para se utilizar no referido trabalho.

As propriedades mecânicas dos hidrogéis foram avaliadas no reômetro AR 550 da TA Instrument com uma geometria de placa paralela de 20 mm de diâmetro em frequência, tensão e temperatura de 0,15 Hz, 1,5 Pa e $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (valores determinados com base na região viscoelástica dos materiais), respectivamente. Neste ensaio acompanhou-se o comportamento do módulo G' em função do tempo. Todas as análises deste tópico foram realizadas em triplicata.

3.11.2 Determinação do tempo de geleificação dos hidrogéis

Para acompanhar o tempo de gelificação por reologia, utilizou-se o reômetro AR 550 da TA Instrument e a mesma geometria descrita no item 3.11.1. Esses experimentos consistiram no acompanhamento da variação do módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') em função do tempo, em que 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 $t = 30$ s após a mistura das soluções.

3.11.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise foi realizada a partir dos hidrogéis secos por liofilização. Os espectros de FTIR foram obtidos em pastilhas de brometo de potássio (KBr) em equipamento da Shimadzu modelo IR Tracer-100, operando numa faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 25 varreduras.

3.11.4 Avaliação da capacidade de absorção de água (intumescimento) dos hidrogéis

Foram realizados ensaios de intumescimento dos hidrogéis 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 delicadamente com papel filtro e a sua massa medida (M_u). O intumescimento foi obtido pela Equação 7 e o ensaio foi realizado em triplicata.

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{M_u - M_s}{M_s} \times 100 \quad (7)$$

Em que: M_u é a massa inicial seca do material e M_s corresponde a massa seca após secagem com palpe filtro.

3.11.5 Avaliação da perda de massa (degradação) *in vitro* dos hidrogéis

A degradação dos *scaffolds* foi avaliada segundo metodologia descrita por Balakrishnan et al. (2017). As amostras dos materiais, imersas em 20 mL de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,4), foram mantidas em incubação (37 °C, 100 rpm) durante intervalos de tempo pré-determinados (1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias). Ao fim de cada período, os suportes porosos foram lavados em recipiente permeável (sob agitação em mesa agitadora) com água destilada até que a condutância do meio alcançasse o valor de 2 μS cm⁻¹. Em seguida, 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 8.

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{|M_i - M_s|}{M_i} \times 100 \quad (8)$$

Em que: M_i é a massa inicial seca do material e M_s corresponde a massa seca após a degradação e liofilização.

3.11.6 Avaliação da porosidade dos hidrogéis

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 9.

$$\text{Porosidade (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{dV} \times 100 \quad (9)$$

Em que: W_1 e W_2 são as massas 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.

3.11.7 Análise morfológica dos hidrogéis por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A estrutura porosa dos hidrogéis foi examinada através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando um microscópio de emissão Quanta FEG FEI 450. Os hidrogéis foram preparados em seringas de 3 mL, deixados em repouso por 24 h (para uma completa gelificação) e, em seguida, congelados em um ultra freezer -80 °C por 48 h e depois liofilizados. Os *scaffolds* liofilizados foram colocados em nitrogênio líquido e logo depois fracionados. Os fragmentos foram colocados em suporte de alumínio (stub), fixados com fita de dupla-face de carbono e recobertos por deposição de íons metálicos de ouro. As análises foram realizadas na central analítica da Universidade Federal do Ceará.

O diâmetro médio de poros dos *scaffolds* (suporte porosos) em diferentes graus de oxidação foi estimado utilizando 50 medidas de diâmetros de poros provenientes da imagem obtida pelo MEV. Os valores destas medidas foram coletados com o uso do programa ImageJ.

3.11.8 Avaliação da injetabilidade *in vitro* dos hidrogéis

O ensaio de injetabilidade foi realizado misturando as duas soluções (GGOx e CEQ), com (5%) ou sem VB (0%), em uma seringa de 1 mL com cânula 26G (0,45x13 mm). As soluções foram misturadas invertendo a seringa e após 2 min foram injetadas em uma placa de Petri (Figura 11).

Figura 11 – Representação esquemática da análise de injetabilidade



Fonte: próprio autor.

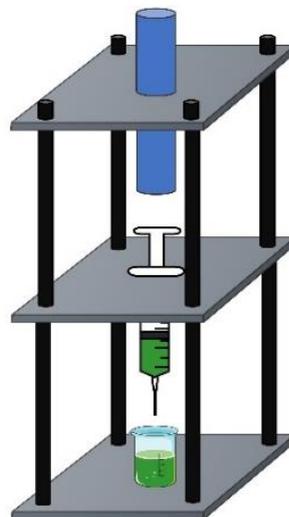
3.11.9 Avaliação da seringabilidade dos hidrogéis

A seringabilidade das amostras foi quantificada em termos da massa residual de hidrogel retida nas seringas após aplicação de uma força constante de 5 N durante 10s. O teste de seringabilidade foi realizado com aparato desenvolvido (Figura 12) conforme proposto por Alves e colaboradores (ALVES; DOS SANTOS; BERGMANN, 2008). Seringas descartáveis poliméricas de 1mL (Descarpack®) foram equipadas com agulha 21G^{1/4} (30x0,8 mm). A seringa foi suavemente preenchida com os hidrogéis para evitar a retenção de ar. A seringabilidade foi calculada de acordo com a seguinte Equação 10.

$$\text{Seringabilidade (\%)} = \frac{M_e}{M_a} \times 100 \quad (10)$$

Em que: M_e é a massa expelida da seringa durante o experimento e M_a é a massa de amostra antes da injeção.

Figura 12 – Representação esquemática do aparato para análise de seringabilidade.



Fonte: próprio autor.

3.11.10 Avaliação das propriedades de Self-healing (autocura)

A capacidade de autocura (*Self-healing*) foi avaliada por teste de recuperação reológica no reômetro AR 550 da TA Instrument (os discos de hidrogéis foram preparados com 20 mm de diâmetro e 1 mm altura). Primeiro usou-se o método de varredura de amplitude de cisalhamento (γ de 1% a 100%), para determinar o valor da deformação crítica máxima que o hidrogel poderia suportar. Em seguida, os discos com a mesma forma foram usados para testar

o comportamento de autocura por teste de varredura de deformação alternada com ângulo fixo de frequência (1 Hz) (YIN *et al.*, 2023).

Deformações oscilatórias foram alternadas entre baixa deformação ($\gamma = 1,0\%$, 100 s para cada intervalo) para alta deformação ($\gamma = 60\%$, 100 s para cada intervalo) e foram realizados 3 ciclos de *strain* completos (DING, *et al.*, 2023).

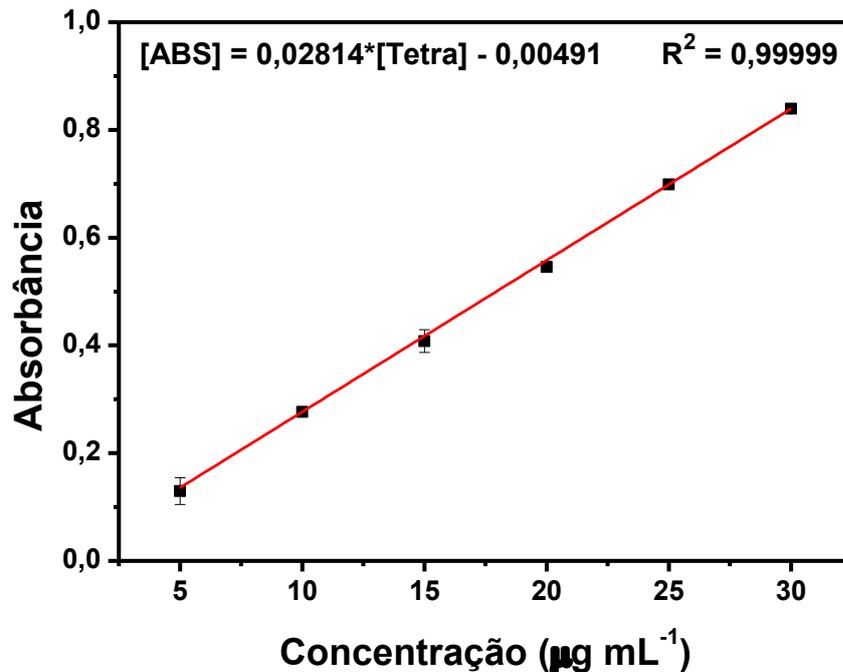
As propriedades da viscosidade do hidrogel foram caracterizadas medindo sua viscosidade linear (η) sob um modo de varredura de frequência variando de 0,1 a 25 Hz.

3.11.11 Preparação dos hidrogéis com tetraciclina e ensaio de liberação

O fármaco tetraciclina foi utilizado nesse trabalho para evidenciar que os hidrogéis estudados apresentam potencial aplicação na liberação controlada de fármaco como também potencializar a atividade antibactericida da quitosana que já é bem relatada na literatura (ARDEAN *et al.*, 2021) e possível aplicação como curativo em regiões cutâneas.

As soluções de goma guar oxidada e carboxietilquitosana foram preparadas na concentração de 2% (m/v) usando água deionizada como solvente. A essas soluções foi adicionado o fármaco tetraciclina (Tetra) de forma a obter concentração de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ e o hidrogel preparado pela mistura de volumes iguais (500 μL) das soluções em uma seringa de 10 mL. Após 24 h de reticulação, o hidrogel foi transferido para o recipiente de liberação com 10 mL de tampão fosfato (pH 7,4; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). O recipiente de liberação foi colocado em uma incubadora a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação (75 rpm). Periodicamente, 1 mL do meio de liberação foi coletado, analisado por espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-vis) ($\lambda_{\text{abs}} = 362 \text{ nm}$, Shimadzu UV-1800) e devolvida ao sistema de liberação. A quantidade de tetraciclina liberada foi quantificada usando uma curva de calibração de tetraciclina em tampão fosfato (Figura 13), em seguida, essa massa de tetraciclina liberada foi convertida em porcentagem de fármaco liberado de acordo com a Equação 11.

Figura 13 - Curva de calibração da Tetra em tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹) no UV vis ($\lambda = 362$ nm)



Fonte: dados da pesquisa.

$$\text{Porcentagem de fármaco liberado (\%)} = \frac{M_t}{M_0} \times 100 \quad (11)$$

Em que: M_t é a quantidade de fármaco liberado no tempo t e M_0 é a quantidade inicial de fármaco no hidrogel.

3.12 Caracterização biológica *in vitro* dos hidrogéis

3.12.1 Análise dos produtos em linhagem de fibroblastos (L929)

O teste do MTT se baseia na capacidade das enzimas oxidorreductase celulares dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para reduzir o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT), de cor amarela, para o formazan, um composto de cor púrpura (BERRIDGE *et al.*, 1996), o que permite a quantificação indireta da porcentagem de células vivas.

As células L929 foram plaqueadas nas concentrações de $0,1 \times 10^6$ cél/mL em placas de 96 poços. Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi retirado e adicionado 200 µL com os extratos dos hidrogéis e seus polissacarídeos precursores, enquanto o controle negativo recebeu apenas meio DMEM. As placas foram incubadas por 69 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Decorrido o tempo determinado, o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (0,5 mg mL⁻¹), e as placas foram incubadas por 3 h. A

absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 μL de DMSO puro em leitor de microplaca (Molecular Devices, Spectramax 190) sob o comprimento de onda de 595 nm.

Análise estatística

Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão (DP). Os valores das absorbâncias foram transformados em viabilidade celular a partir dos valores de absorbância previamente normalizados com base na média da absorbância do controle negativo utilizando o programa Graph Pad Prism versão 8.0.

3.12.2 Análise dos produtos em linhagem de osteoblastos

Ensaio de citotoxicidade por MTT

As células OFCOL II (osteoblastos) foram plaqueadas em placas de 96 poços ($3,8 \times 10^3$ cél/poço). Após 24 horas de incubação, o meio de cultivo celular foi removido, e foi adicionado 200 μL de meio exposto à GGOx 50-CEQ-VB e GGOx 50-CEQ (24 h de exposição antes do ensaio). Cada grupo de tratamento foi plaqueado em sextuplicata. A placa foi incubada por 24 h em incubadora a 5% de CO_2 e temperatura controlada de 37 °C. Após o tempo de tratamento, foram adicionados 20 μL da solução de MTT (5 mg mL^{-1}), e a placa foi incubada por 4 h. A absorbância foi lida após dissolução dos cristais de formazan com 100 μL de DMSO por poço, utilizando leitor de microplaca sob o comprimento de onda de 570 nm. Ressalta-se que o percentual de viabilidade foi calculado a partir da seguinte fórmula (LEE *et al.*, 2016): (absorbância da amostra \div absorbância do controle) \times 100.

Análise estatística

Inicialmente foi realizado o teste de Shapiro Wilk para investigar a aderência dos dados à distribuição normal. Como os dados se mostraram não paramétricos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para comparar o percentual de viabilidade entre os grupos. Para análise descritiva, os dados foram expressos como média e erro padrão da média. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5% e o programa Graph Pad Prism versão 8.0.1 foi utilizado para as análises.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterizações da goma guar e seus derivados oxidados

4.1.1 Degradação ácido/etanol da GGP e GGD

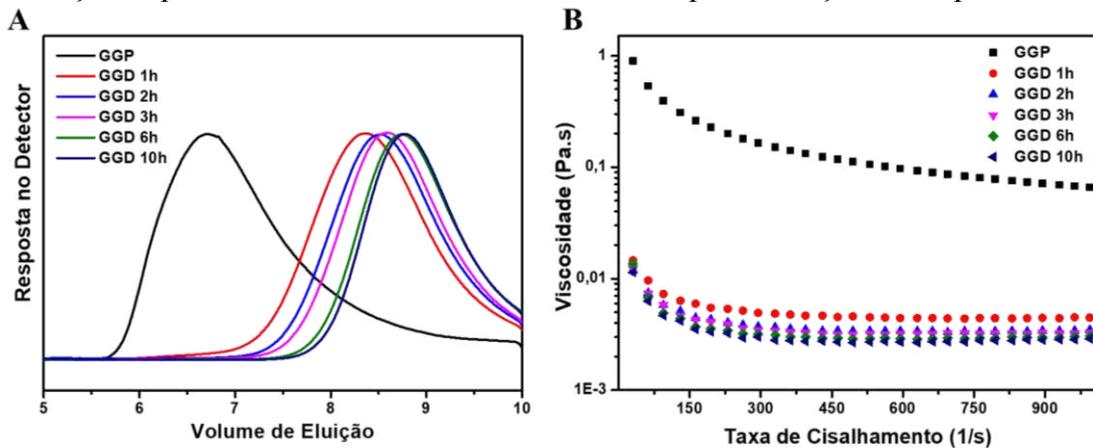
A goma guar purificada (conforme metodologia apresentada no item 3.3) foi despolimerizada em diferentes tempos de reação (1, 2, 3, 6, 10 h) com o intuito de se obter a melhor condição quanto a solubilidade do material (pois quanto maior o tempo reacional, maior será a sua degradação e mais solúvel será o polissacarídeo), condição essa que será utilizada no decorrer desse trabalho.

Na Figura 14A são mostrados os cromatogramas de distribuição de massa molar obtidos por GPC da solução de goma guar antes e após a degradação ácido/etanol. Os cromatogramas apresentaram perfis semelhantes, com distribuição de tamanhos unimodais para todas as condições estudadas. As massas molares de pico (M_{pk}) foram determinadas pela curva de calibração da pululana (Equação 12).

$$\text{Log } M_{pk} = (-1,12 \times V_e) + 14,33 \quad r^2 = 0,992 \quad (12)$$

onde: V_e é o volume de eluição da amostra.

Figura 14 – Cromatogramas de GPC da GGP e GGD (A) e curvas de viscosidades (B) para as soluções aquosas de GGP e GGD em diferentes tempos de reação de despolimerização



Fonte: dados da pesquisa.

A massa molar de pico (M_{pk}) da GGP, como mostrado na Tabela 3, equivale a $6,47 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$, esse valor está bem próximo ao reportado por Sharma *et al.* (2018) para massa molar entre 1×10^6 e $2 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$.

Para os produtos de degradação (GGD) é observado um aumento no volume de eluição com o aumento do tempo reacional, registrando, dessa forma, um decréscimo da massa molar de pico M_{pk} (Tabela 3). A partir desses resultados pode-se comprovar que a reação de degradação empregada foi eficiente em reduzir a massa molar da goma guar purificada devido à clivagem das cadeias de galactose e manose na cadeia principal e ramificações (VINÍCIUS *et al.*, 2019).

Tabela 3 - Comparação dos valores da massa molar da GGP e GGD em diferentes tempos de reação

Amostras	Ve (mL)	M_{pk} (g mol⁻¹)
GGP	6,72	$6,47 \times 10^6$
GGD 1h	8,36	$8,76 \times 10^4$
GGD 2h	8,51	$5,94 \times 10^4$
GGD 3h	8,59	$4,91 \times 10^4$
GGD 6h	8,73	$3,32 \times 10^4$
GGD 10h	8,77	$3,04 \times 10^4$

Fonte: dados da pesquisa.

Comparando todas as reações com diferentes tempos de degradação, a reação com 1 h foi escolhida para ser utilizada nesse trabalho, pois a massa molar é 135 vezes menor quando comparada com a massa molar da GGP. As demais reações com intervalos de 2 a 10 h apresentaram valores bem próximo sem uma variação de M_{pk} (de $8,76 \times 10^4$ a $3,04 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$), pois não houve uma alteração expressiva em suas ordens de grandeza.

Essas reduções na M_{pk} foram corroboradas por reologia de fluxo, como pode ser observado na Figura 14B. É nítido que a solução de goma guar degradada pelo tratamento ácido/álcool apresentou menor viscosidade em todo intervalo de varredura de cisalhamento comparado com a GGP ($0,004$ e $0,062 \text{ Pa s}^{-1}$), assim a reação com 1 h foi suficiente para se obter uma melhoria considerável na solubilidade desejada do derivado de GGD.

Por meio do conjunto de resultados até aqui demonstrados, pode-se afirmar que o tratamento ácido/etanol resultou em um produto com propriedades físico-químicas melhoradas que favorecem a manipulação e dissolução da goma guar.

4.1.2 FTIR e RMN ¹H da GGP e GGD

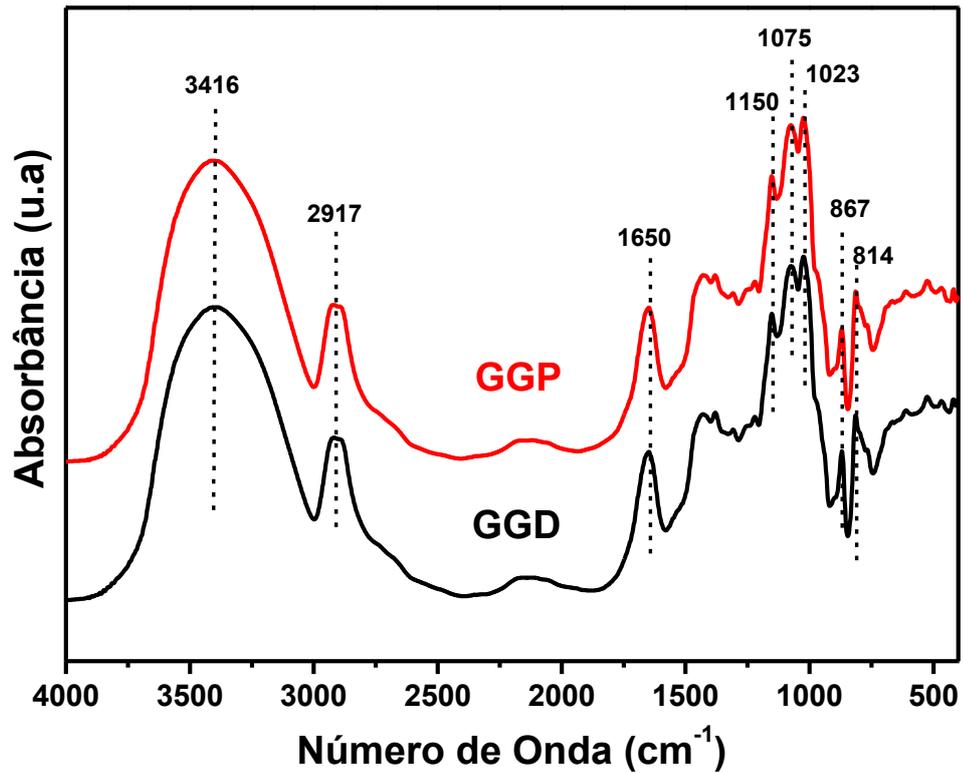
Com o intuito de analisar se houve uma modificação funcional no produto parcialmente despolimerizado, foram obtidos os espectros na região do infravermelho para GGP e GGD (Figura 15).

Os espectros de FTIR tanto da goma guar purificada (GGP) como da goma guar degradada (GGD) são mostrados na Figura 15 e ambos apresentaram bandas características, que estão em consonância com as estruturas típicas de galactomanas encontradas na literatura (SANTOS *et al.*, 2019).

As bandas em 814 e 867 cm⁻¹ são referentes as configurações anoméricas e ligações glicosídicas das unidades α-D-galactopyranose e β-D-mannopyranose, respectivamente (CERQUEIRA *et al.*, 2011). A região entre 1023 e 1150 cm⁻¹ resulta dos modos de estiramento C-C-O, C-OH e C-O-C acoplados na estrutura do polissacarídeo. A banda em 1650 cm⁻¹ é associada com a deformação do grupo OH das moléculas de água adsorvidas (GOMES *et al.*, 2020). As bandas largas em 2917 e 3416 cm⁻¹ advém, respectivamente, dos estiramentos das ligações C-H e O-H (ZHANG *et al.*, 2019).

Comparando os dois espectros de infravermelho entre a GGP e GGD, não foi possível observar uma mudança significativa, sugerindo que a degradação ácido/etanol não modificou a composição funcional.

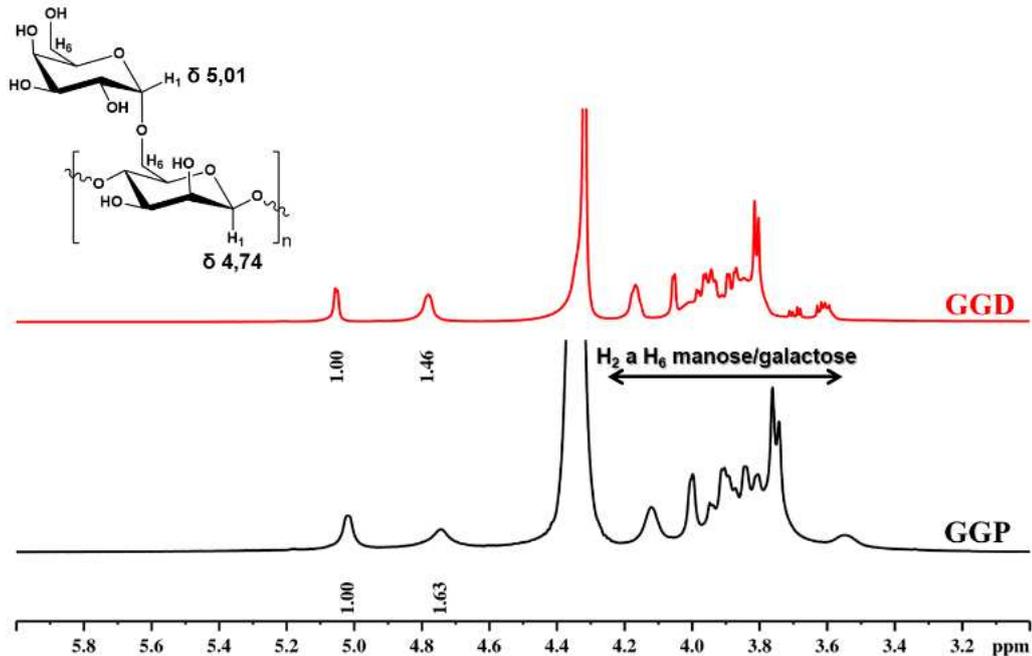
Figura 15 – Espectro na região de infravermelho para GGP e GGD



Fonte: dados da pesquisa.

As possíveis modificações estruturais pós-processo de degradação foram investigadas fazendo uso da ressonância magnética nuclear de prótons (Figura 16). Nas amostras analisadas, os sinais em δ 5,01 e 4,74 ppm são designados ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico das unidades α -D-galactopiranosose e β -D-manopiranosose, respectivamente. Os sinais localizados entre δ 3,55 e 4,12 ppm são atribuídos aos demais prótons do polissacarídeo (H₂ a H₆) (XU *et al.*, 2020).

Figura 16 – Espectro de RMN ^1H para a GGP e GGD obtidos à 70 °C em D_2O



Fonte: dados da pesquisa.

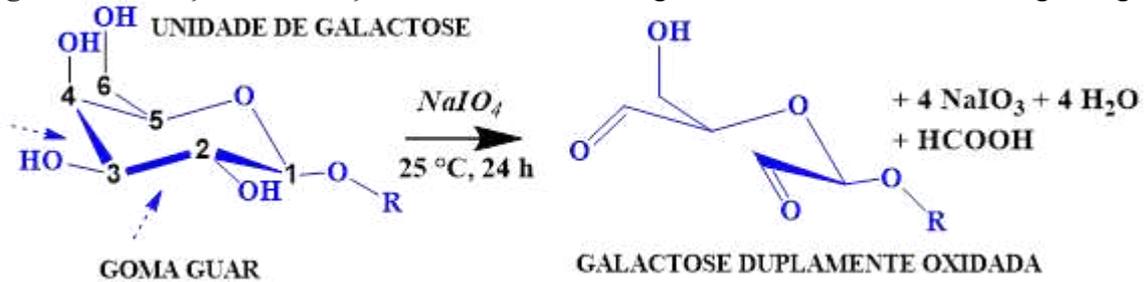
A razão entre as unidades de manose e galactose (M:G) pode ser obtida pela integração relativa das áreas referentes aos prótons anoméricos. A razão M:G para GGP foi de 1,63:1 - dentro da faixa relatada na literatura de 1,5 a 2,0. Essas variações podem ser causadas por distinções nas colheitas, condições de extração e lotes de fabricação (MARTIN; SASSAKI; SIERAKOWSKI, 2020; TYAGI *et al.*, 2020).

O valor da razão M:G para GGD foi de 1,46:1 - ligeiramente menor do que àquele calculado para GGP. A despolimerização utilizada não é seletiva, podendo clivar a ligação glicosídica entre M-M e M-G. A redução no valor da razão M:G permite inferir que durante o tratamento a despolimerização aconteceu também na cadeia principal. Esse comportamento também foi observado por Buriti *et al.*, 2014, no qual houve redução de 3,65:1 para 3,24:1 para a galactomanana de *Caessalpinia pulcherrima* antes e após a hidrólise parcial, respectivamente.

4.1.3 Determinação do grau de oxidação por titulação potenciométrica

Foi utilizado a GGD seguindo o método de Rodrigues; Paula; Costa (1993) em todas as análises. A reação da GGD oxidada (GGOx) com NaIO_4 é mostrada na Figura 17. A presença dos grupos dialdeídicos foi confirmada utilizando método de titulação potenciométrica com cloridrato de hidroxilamina.

Figura 17 - Reação de oxidação de uma unidade de galactose da cadeia lateral da goma guar

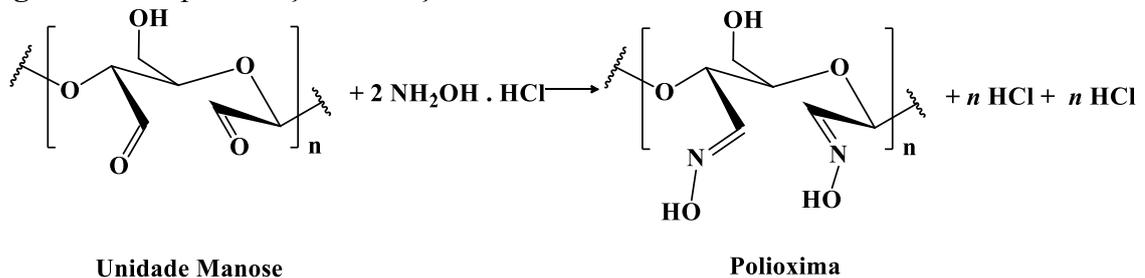


Fonte: próprio autor.

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 2 a quantidade de material é dividida por dois.

Na Figura 18 é mostrada 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 $0,0991 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 18 - Representação da reação entre uma unidade de manose oxidada e $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$



Fonte: próprio autor.

A Tabela 4 apresenta os valores dos graus de oxidação teóricos e reais para os derivados da GGOx, 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 4 - Dados reacionais da goma guar com periodato de sódio a temperatura ambiente

Amostras ^a	Volume de NaOH (mL) ^b	Grau de Oxidação ^c	Rendimento final da reação (% em massa) ^d
GGOx 30	0,78	29,0 ± 0,02	88,3 ± 0,9
GGOx 50	1,26	47,4 ± 0,41	85,9 ± 1,2
GGOx 70	1,61	60,6 ± 1,25	82,1 ± 1,5

^a A nomenclatura 30, 50 e 70 indica a % teórica em mol de NaIO₄ adicionado a unidade monossacarídica.

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

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

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

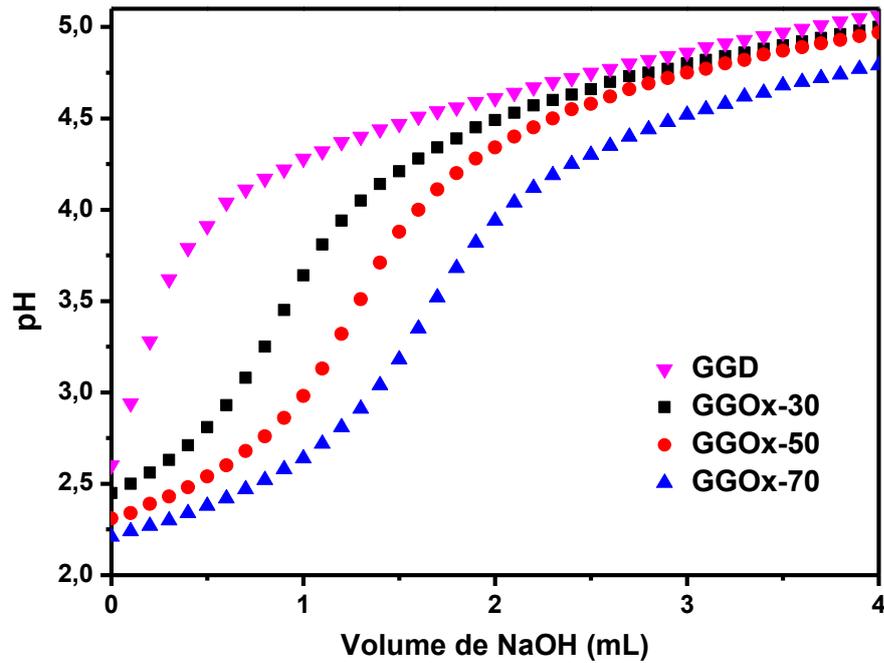
Fonte: dados da pesquisa.

Os hemiacetais envolvem grupos hidroxílicos em sua formação. No caso da goma guar 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 88 e 82%, 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 do cajueiro (86–91%) (MACIEL *et al.*, 2019), alginato (90%) (BANIASADI *et al.*, 2016).

A Figura 19 apresenta as curvas de titulação potenciométrica dos derivados polioxima com NaOH 0,1 mol L⁻¹, mostrando a evolução do pH das soluções tituladas. Observa-se que a curva correspondente à amostra GGD não exibe um perfil típico de titulação (sigmoidal), ou seja, não se evidencia um ponto de equivalência. Isso ocorre porque a GGD não apresenta grupos aldeídos e consequentemente não reagiu com a hidroxilamina formando HCl. Neste caso, nota-se somente um aumento no pH à medida que o NaOH é adicionado. Em contraste, as curvas relacionadas as outras amostras exibem claramente ponto de equivalência, evidenciando assim a titulação do HCl liberado após a reação da hidroxilamina com o as unidades oxidadas do polissacarídeo.

Figura 19 – Curva de titulação dos derivados oxidados com NaOH 0,1 mol L⁻¹, para GGD, GGOx 30, GGOx 50 e GGOx 70

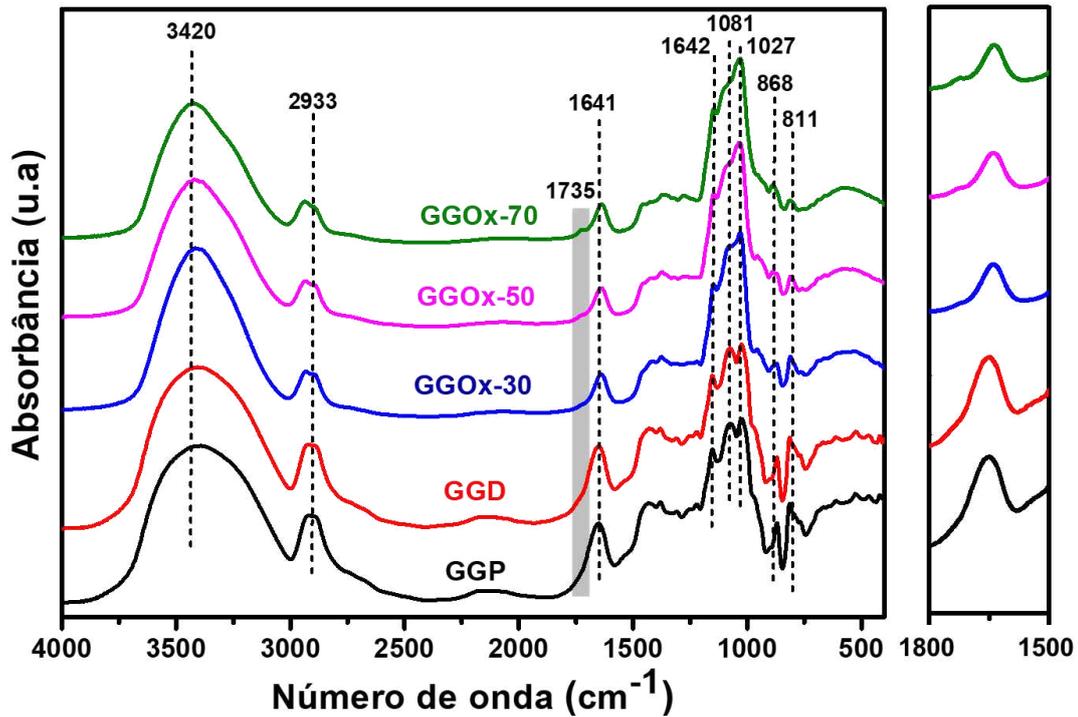


Fonte: dados da pesquisa.

4.1.4 Caracterização dos derivados oxidados por FTIR e RMN ¹H

Com o objetivo de analisar a introdução de novos grupos funcionais, foram obtidos os espectros na região do infravermelho para GGD e seus derivados oxidados (Figura 20).

Figura 20 – Espectros de FTIR da GGD, GGP e seus derivados oxidados e amplitude da região entre 1500 a 1800 cm^{-1} do espectro



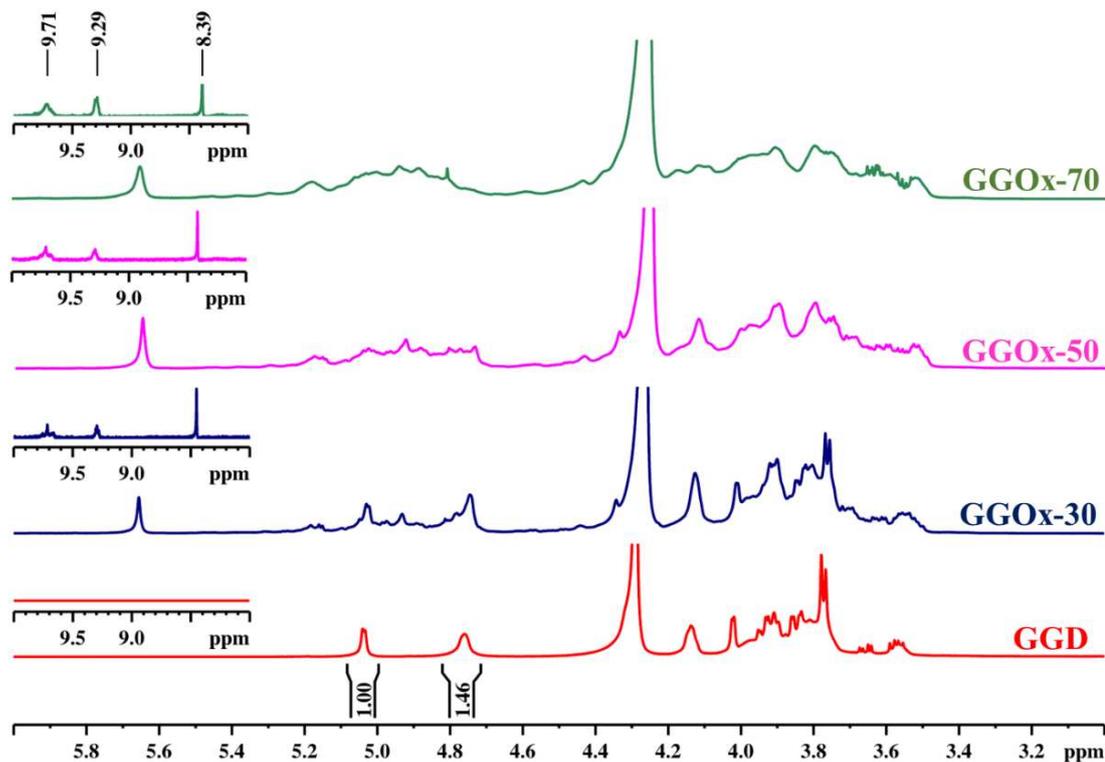
Fonte: dados da pesquisa.

Pode-se observar que os espectros dos diferentes derivados oxidados apresentaram bandas características e comuns as do espectro da GGP e GGD, indicando que a natureza da goma se mantém nas estruturas modificadas.

Uma nova banda apareceu em torno de 1735 cm^{-1} nos espectros das gomas oxidadas (com visualização mais nítida com a expansão da região entre 1500 e 1800), que é atribuída ao estiramento da ligação C=O de aldeído, confirmando a modificação pela oxidação. Foi observado que a intensidade relativa dessa banda está diretamente relacionada ao grau de oxidação, ou seja, quanto maior o grau de oxidação maior a intensidade relativa dela. Sua baixa intensidade é devido ao fato de os grupos aldeídos reagirem com os grupos hidroxilas adjacentes, formando estruturas hemiacetálicas (LIMA *et al.*, 2020).

A Figura 21 apresenta os espectros de prótons para GGD e seus derivados oxidados.

Figura 21 – Espectros RMN ^1H da GGD e de seus derivados oxidados obtidos a 70 °C em D_2O



Fonte: dados da pesquisa.

Os espectros de GGOx 30, GGOx 50 e GGOx 70 apresentam novos sinais que indicam a modificação da estrutura por reação de oxidação. No espectro da GGD, os sinais dos prótons anôméricos em δ 5,03 e 4,74 ppm são atribuídos ao H-1 da α -D-galactose e β -D-manose, respectivamente. A relação manose:galactose (M:G), calculada a partir da integração na região dos sinais anoméricos, foi de 1,46:1.

Nos espectros dos derivados oxidados, observa-se o aparecimento de novos sinais na região de δ 4,7 a 5,2 ppm que correspondem aos prótons de carbonos anoméricos e estão relacionados à formação de estruturas hemiacetálicas. Esses sinais (Figura 21) se tornaram mais evidentes nos espectros dos derivados com grau de oxidação mais elevados (GGOx 50 e GGOx 70). Eles também foram observados nos espectros da galactomanana de *Delonix regia* (LIMA *et al.*, 2020), goma do cajueiro oxidada (MACIEL *et al.*, 2019) e *succinoglicana* oxidada (KIM *et al.*, 2020).

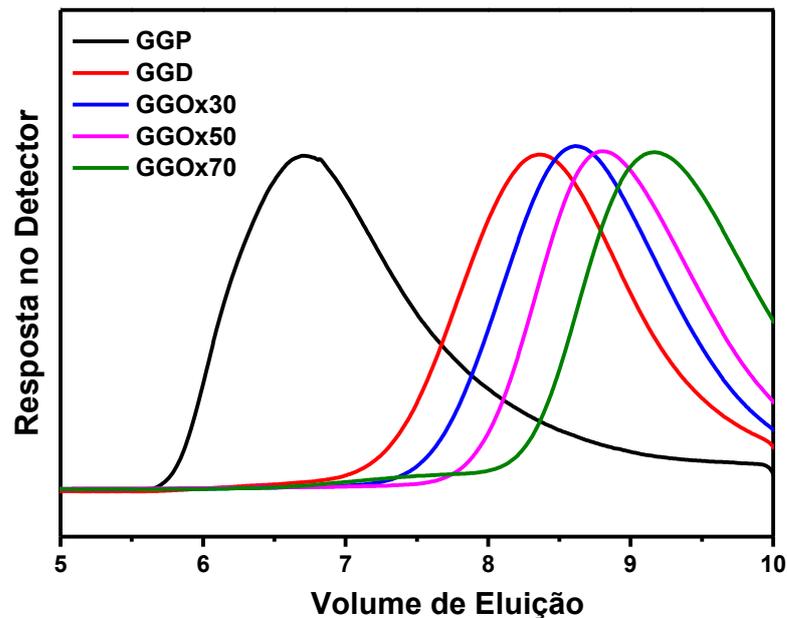
Os novos sinais na faixa de δ 8,45 a 9,70 ppm são atribuídos aos hidrogênios dos grupos aldeídicos em diferentes unidades monossacarídicas. A baixa intensidade desses sinais pode ser explicada pela formação de hemiacetais, hemialdais ou hidratos. Baseado na literatura, os sinais em δ 4,94, 5,18 e 5,65 ppm, presentes nos derivados oxidados, indicam a geração

dessas subestruturas (AMER *et al.*, 2016; LOU *et al.*, 2020; MACIEL *et al.*, 2019; ŠEDOVÁ *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2020).

4.1.5 Estimativa da massa molar da GGD e seus derivados oxidados

A Figura 22 apresenta os cromatogramas de GPC da GGP, GGD e dos seus derivados oxidados GGOx 30, GGOx 50 e GGOx 70 (todos apresentaram perfis unimodais). Os valores de massa molar de pico (M_{pk}) e volume de eluição (V_e) estão exibidos na Tabela 5.

Figura 22 – Cromatogramas de GPC da GGP, GGD e dos seus derivados oxidados



Fonte: dados da pesquisa.

Como observado na Tabela 5, a oxidação com periodato de sódio provocou uma redução na massa molar dos derivados oxidados GGOx 30, GGOx 50 e GGOx 70 de 1,9, 3,1 e 7,9 vezes (em relação a GGD), respectivamente. Esse resultado pode ser atribuído à clivagem da cadeia polimérica do polissacarídeo, causada pela oxidação que depende diretamente da quantidade de periodato de sódio em solução. Como a cadeia principal (manose) de galactomananas possui padrão de ligação 1→4, a oxidação pelo íon periodato pode ocorrer também nas cadeias laterais (galactose), o que justifica a diminuição na massa molar dos derivados oxidados. Resultados semelhantes foram obtidos para alginato de sódio oxidado (BALAKRISHNAN *et al.*, 2005), goma do cajueiro oxidado (FERREIRA *et al.*, 2021) e xilana oxidado (AMER *et al.*, 2016).

Tabela 5 - Comparação dos valores da massa molar da GGP e GGD e de seus derivados oxidados

Amostras	Ve (mL)	Mpk (g mol ⁻¹)
GGP	6,72	6,47 x 10 ⁶
GGD	8,36	8,76 x 10 ⁴
GGOx 30	8,61	4,59 x 10 ⁴
GGOx 50	8,80	2,82 x 10 ⁴
GGOx 70	9,16	1,11 x 10 ⁴

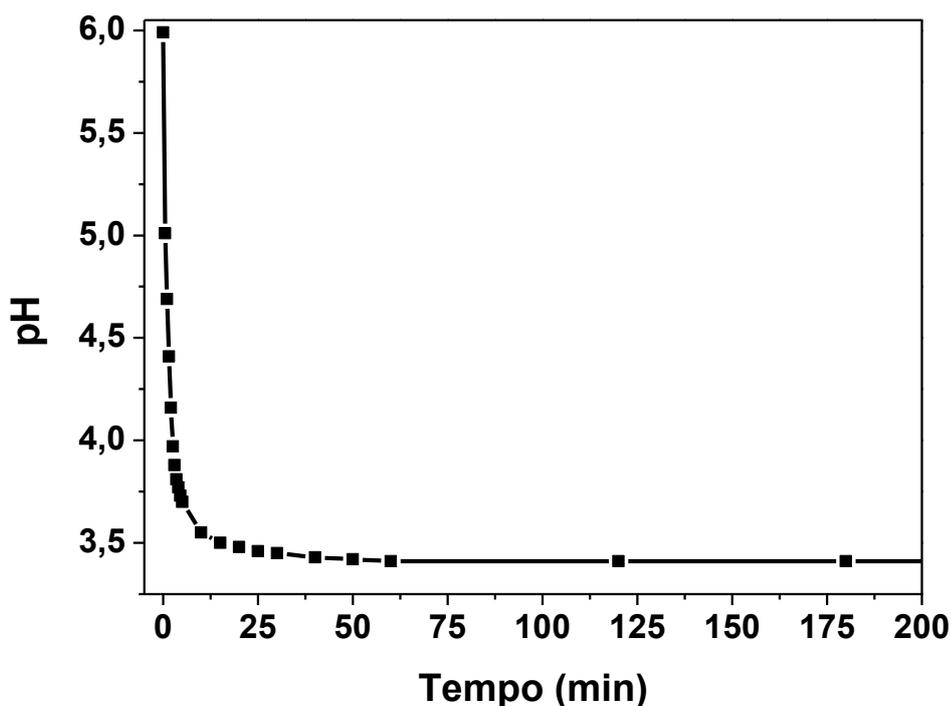
Fonte: dados da pesquisa.

4.1.6 Variação do pH durante a reação de oxidação da goma guar oxidada

Com o objetivo de observar a duração do tempo de oxidação da reação estudada, realizou-se um experimento no qual observa-se a liberação do ácido fórmico como subproduto da reação de oxidação por meio da diminuição do seu pH.

A Figura 23 apresenta a variação do pH com o decorrer da reação de oxidação durante os primeiros 200 minutos para o derivado oxidado GGOx 50.

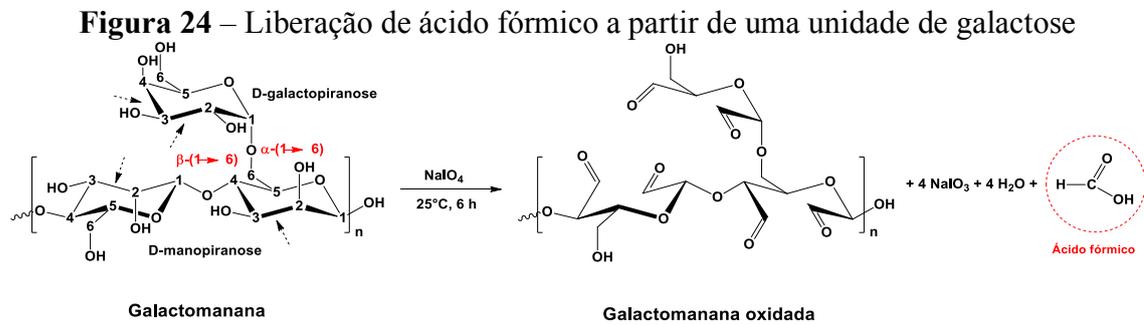
Figura 23 – Variação do pH durante a reação de oxidação da goma guar com periodato de sódio



Fonte: dados da pesquisa.

O íon periodato desencadeia uma reação ao atacar as hidroxilas presentes nas posições C2-C3 da molécula de manose, resultando na quebra da ligação C-C e na formação de

dois grupos aldeídicos, conforme relatado por Maia e colaboradores em 2005. Em situações envolvendo unidades glicosídicas contendo α , β e γ -triois, como a galactose, a oxidação resulta na liberação de ácido fórmico como subproduto, levando a uma redução do pH na mistura reacional (conforme ilustrado na Figura 24).



Fonte: próprio autor.

Essa oxidação adicional é consequência do padrão de ligação da unidade de galactose (1 \rightarrow 6) à cadeia principal de manose, levando à liberação de ácido fórmico na posição C3 (Figura 24). Os resultados experimentais revelam que essa reação ocorre rapidamente, pois, após apenas 15 minutos, o pH na mistura reacional para GGOx 50 diminui de 6,0 para 3,5. Após 30 minutos, o pH se estabiliza em torno de 3,4, indicando que a liberação de ácido fórmico cessou.

É importante notar que a oxidação da GGOx 50 continua por um período de 30 minutos, embora na literatura também se encontrem tempos de reação variando de 5 minutos (como mencionado por Yan e colaboradores em 2016) a até 168 horas (conforme relatado por Wu e colaboradores em 2014).

4.2 Caracterização da quitosana (QT) e carboxietilquitosana (CEQ)

4.2.1 RMN ^1H da carboxietilquitosana

A carboxietilquitosana foi preparada a partir da reação da quitosana com o ácido acrílico via adição de Michael tendo água como solvente em diferentes condições (concentração do ácido acrílico, temperatura da reação e tempo reacional), conforme ilustrado na Tabela 6.

O intuito foi escolher a melhor condição (a qual foi utilizada nesse trabalho) que apresente o menor grau de substituição (GS) e solúvel em água, pois como a carboxietilação acontece nas aminas livres e a reação para produção dos hidrogéis (base de *Schiff*) acontece nos

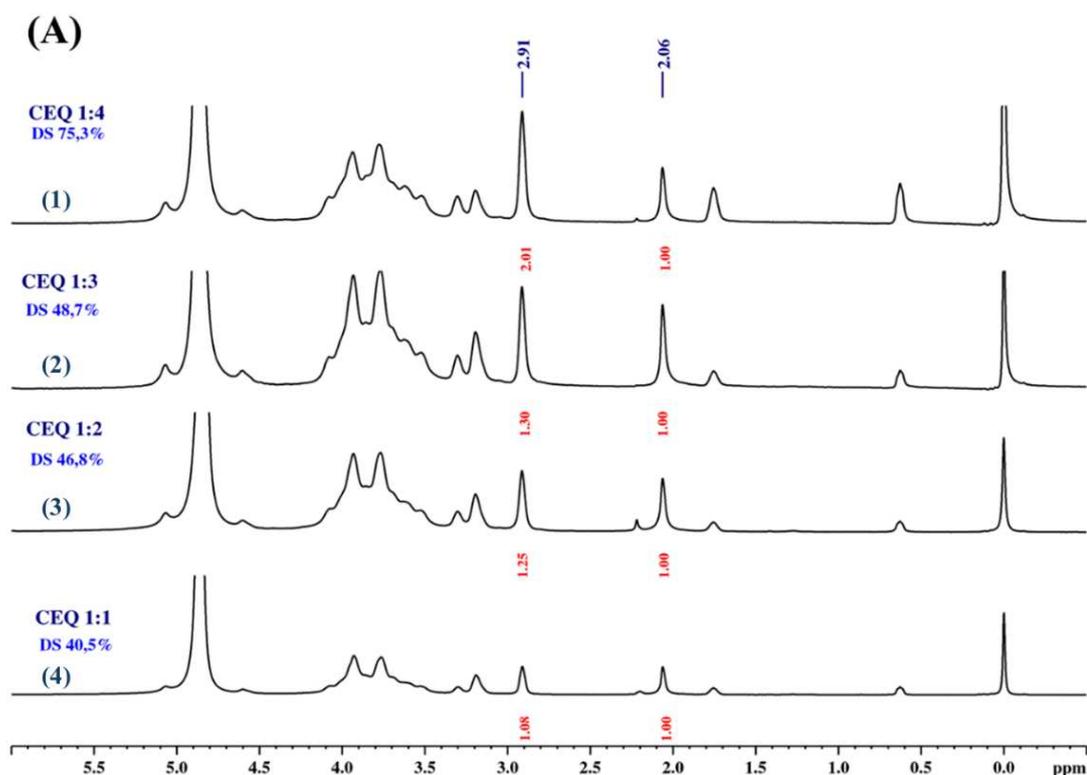
mesmos grupos funcionais, é importante que a quitosana hidrossolúvel ainda contenha em sua estrutura uma quantidade expressiva dessa função livre para a ocorrência da reticulação química entre a carboxietilquitosana e o goma guar oxidada.

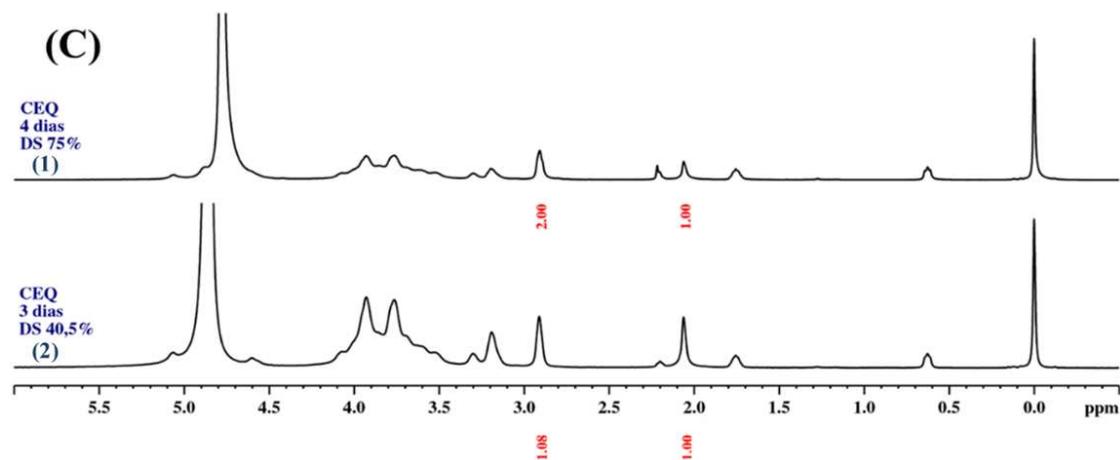
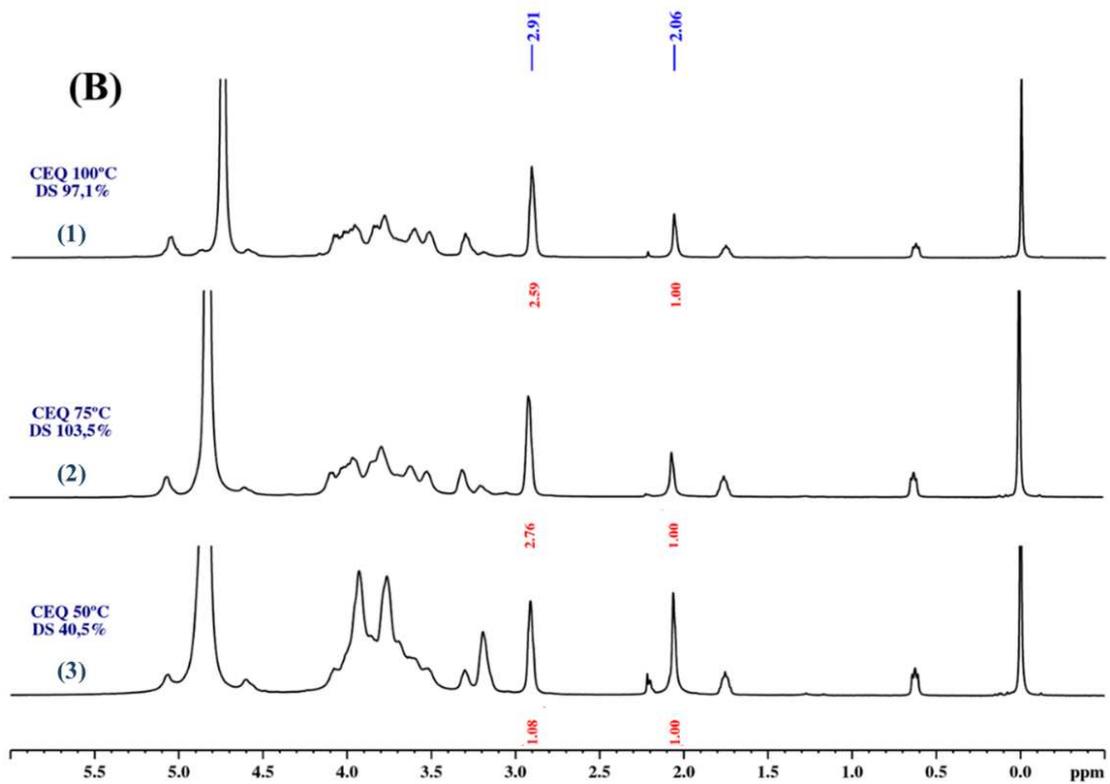
A determinação do GS da CEQ foi calculada a partir do RMN ^1H (Figura 25) e da análise elemental como mostrado na parte experimental e calculado pela Equação 3. O efeito dessas condições de reação tanto do GS quanto da solubilidade estão resumidos na Tabela 6 e na Figura 25.

$$GS = (1 - GD) \times \frac{3ACH_2}{2ACH_3} \quad (3)$$

onde: GD é o grau de desacetilação da quitosana (75% determinado por RMN ^1H) e os valores de 2,03 (singlete, 3H, COCH_3) e 2,53 (singlete, 2H, CH_2COONa).

Figura 25 - RMN ^1H das reações de carboxietilação via reação de Michael em diferentes condições reacionais de razão molar de ácido acrílico/CEQ (A), diferentes temperaturas (B) e mudança nos dias reacionais (C)





Fonte:

dados da pesquisa.

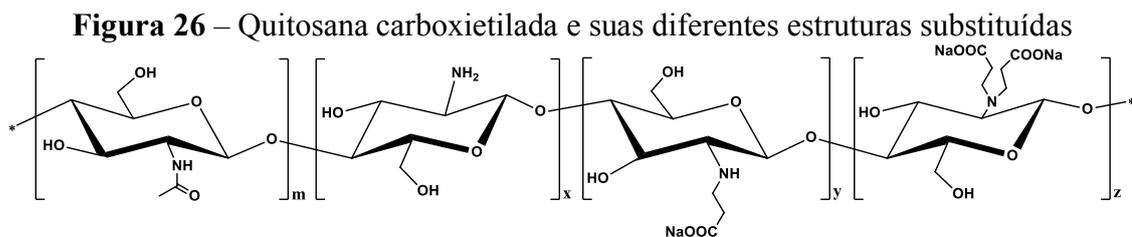
A partir da Tabela 6, pode-se observar que o grau de substituição (GS) da CEQ aumentou à medida que a quantidade de ácido acrílico também aumentou na reação, assim foi escolhida a razão molar 1:1 de QT:AA, pois essa condição contém o menor grau de substituição sendo solúvel em água, deixando assim uma maior quantidade de grupos aminos livres da CEQ para posterior utilização desses grupos para formação de base de *Schiff*.

Ao estudar o efeito de temperatura, verificou-se que o aumento dela foi acompanhado por um aumento no grau de substituição (GS) do produto até atingir 100 °C, assim foi escolhida a temperatura da reação de 50 °C, pois essa condição contém o menor grau de substituição sendo solúvel em água. Além disso, o GS da CEQ cresceu com o aumento do tempo de reação, sendo escolhido o tempo reacional de 72 h, pois apresentou o menor grau de substituição sendo solúvel em água.

Diante dos resultados observados, o derivado escolhido para continuar a preparação dos hidrogéis foi aquele obtido nas seguintes condições reacionais: temperatura de 50 °C, 3 dias de reação e uma razão molar 1:1 de AA:QT. Esse derivado apresentou um GS = 40,5.

Nota-se que em algumas das condições o produto reacional ficou insolúvel e por não se solubilizar não foi possível a determinação do seu GS pelas técnicas utilizadas, sendo possível somente escolher as condições entre os produtos que se tornaram hidrossolúveis.

Também é observado que o espectro B2 (Figura 25B) apresenta um valor de 103,5% de substituição (GS), isso é devido a possibilidade de haver uma dupla substituição nas unidades aminadas da CEQ como mostrado na Figura 26 (HUANG *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2016).



Fonte: próprio autor.

Tabela 6 – Reação de carboxietilação via reação de Michael em diferentes condições reacionais e seu efeito sobre o GD na solubilidade em água

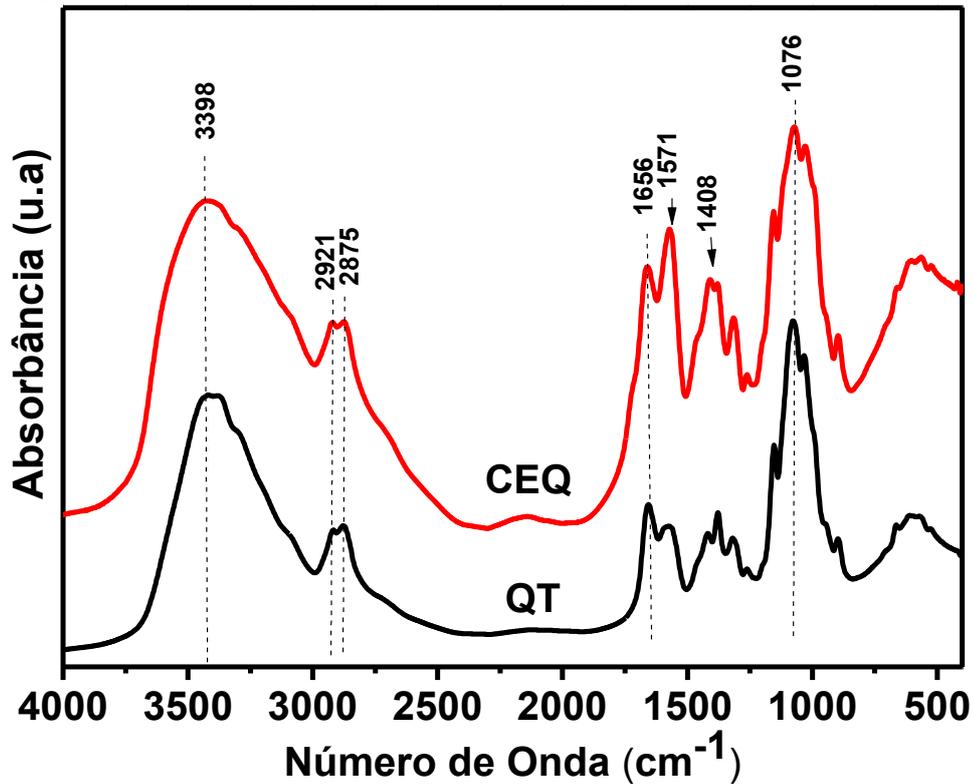
Razão QT:AA	Temperatura (°C)	Tempo (Dias)	GS (%) (RMN ¹H)	GS (%) (Ana. Elem)	Solubilidade em Água
Aumento na razão molar de AA					
1:1	50	3	40,5	41,3	Solúvel
1:2	50	3	46,8	45,9	Solúvel
1:3	50	3	48,5	51,3	Solúvel
1:4	50	3	75,3	72,3	Solúvel
Aumento na Temperatura					
1:1	25	3	-	-	-
1:1	50	3	40,5	41,3	Solúvel
1:1	75	3	103,5	95,3	Solúvel
1:1	100	3	97,1	98,3	Solúvel
Aumento na duração do tempo					
1:1	50	1	-	-	Insolúvel
1:1	50	2	-	-	Solúvel como gel
1:1	50	3	40,5	41,3	Solúvel
1:1	50	4	75	74,3	Solúvel

Fonte: dados da pesquisa.

4.2.2 FTIR e RMN ¹H da quitosana (QT) e carboxietilquitosana (CEQ)

A Figura 27 mostra os espectros de infravermelho para quitosana e seu derivado carboxietilado.

Figura 27 - FTIR da quitosana e carboxietilquitosana em pastilhas de KBr



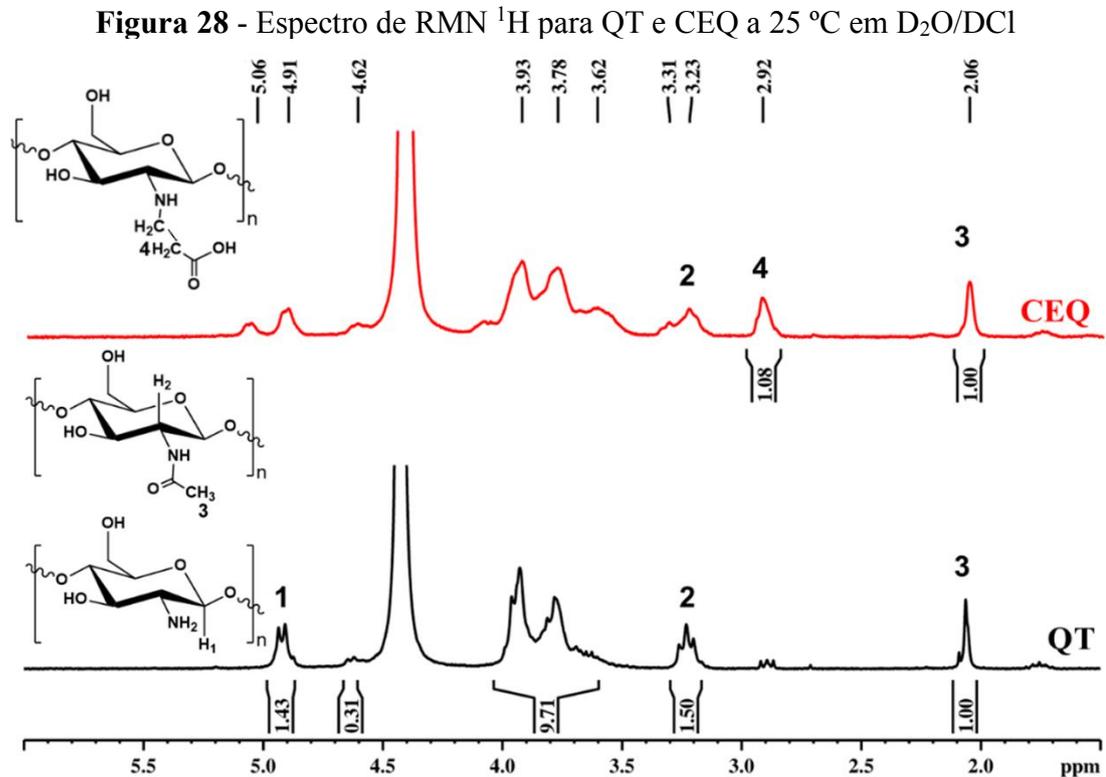
Fonte: dados da pesquisa.

Os espectros apresentam bandas 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 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; ZHONG, 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; 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 o espectro do derivado (CEQ), observa-se o aparecimento de duas novas bandas em 1571 e 1408 cm^{-1} no espectro da CEQ que foi 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.

A ressonância magnética nuclear foi empregada para comprovar a modificação química na quitosana, bem como, através das integrações relativas dos prótons, calcular os graus de desacetilação (GD) do polissacarídeo nativo (Equação 4) e de substituição no derivado (GS) (Equação 3). A Figura 28 apresenta os espectros de prótons para QT e CEQ.



Fonte: dados da pesquisa.

O espectro da QT exibe sinais em δ 2,06, 3,23 e 4,91 ppm que são atribuídos aos prótons do grupo acetil, H_2 e H_1 das unidades *N*-acetil- β -D-glucosamina (os dois primeiros) e β -D-glucosamina (o último) (RINAUDO, 2006).

O espectro de CEQ exibe sinais resultantes dos hidrogênios de QT. A derivação pode ser confirmada pelo novo sinal em δ 2,92 ppm, atribuído aos prótons metilênicos do grupo carboxietil enxertado nos grupos aminos da cadeia de quitosana (FERREIRA *et al.*, 2021).

4.2.3 Determinação da solubilidade em diferentes pH da carboxietilquitosana (CEQ) em meio aquoso

A quitosana foi modificada quimicamente com a introdução de grupos carboxietil para torná-la solúvel em meio aquoso. A reação de adição de Michael entre quitosana e ácido acrílico é uma reação regioesletiva para o grupo amino da quitosana, o qual é um nucleófilo

mais forte que os grupos hidroxilas presentes na estrutura. Essa reação ocorre sem a necessidade de adição de ácidos ou bases, e não forma produtos secundários além da água (PRIVAR *et al.*, 2020).

A introdução de grupamentos carboxietil torna a quitosana solúvel em soluções aquosas neutras ou em soluções básicas. Como é possível observar nas Figuras 29 e 31, o derivado obtido neste estudo (CEQ) apresentou solubilidade nos diferentes pHs estudados (1 – 14), já a quitosana foi solúvel apenas em pH abaixo de 5,5, conforme relatado na literatura (MANIMARAN *et al.*, 2022).

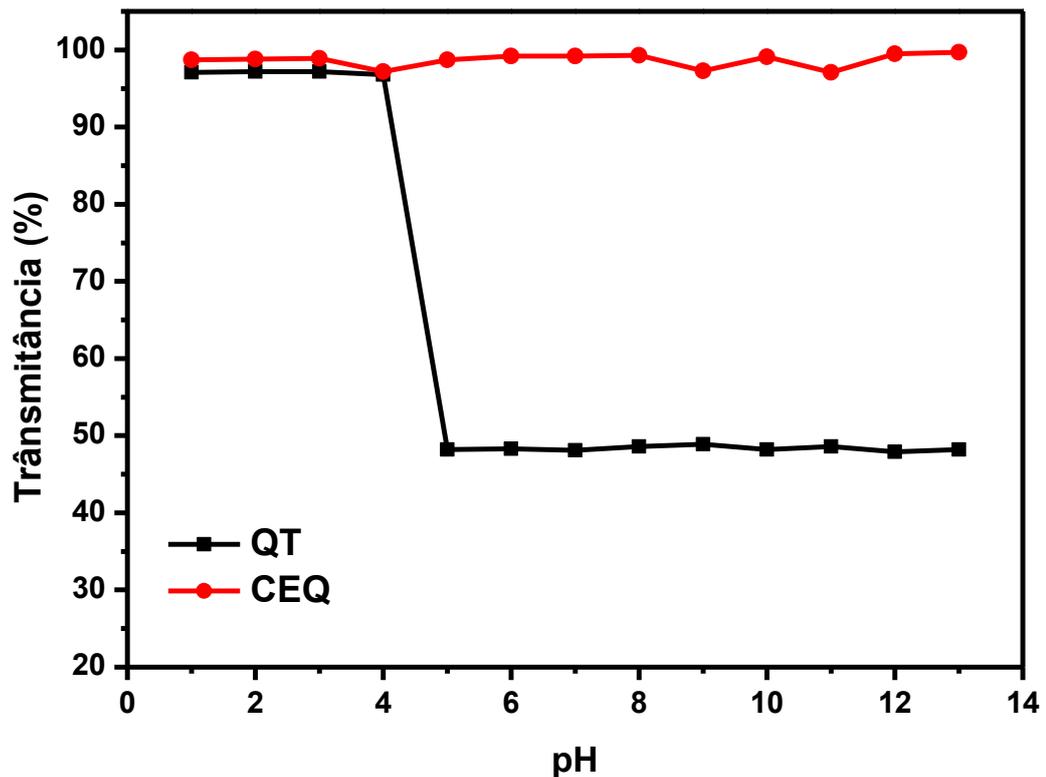
A Tabela 7 mostra que a quitosana (QT) é solúvel em solução aquosa na faixa de pH menor que 1-4, sendo parcialmente solúvel na faixa de pH 5-6 e totalmente insolúvel na faixa de pH 6-14, logo em solução básica, os grupos amino da quitosana tendem a se ionizar, transformando-se em grupos amino protonados (NH_3^+). Essa ionização cria cargas positivas na molécula de quitosana. Como cargas de mesmo sinal se repelem, as moléculas de quitosana carregadas positivamente tendem a se afastar umas das outras, tornando a quitosana insolúvel em meio básico (JHA; MAYANOVIC, 2023).

Tabela 7 – Solubilidade da QT e CEQ em solução aquosa em diferentes valores de pH

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
QT	S	S	S	S	PS	PS	I	I	I	I	I	I	I	I
CEQ	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S = Solúvel, PS = Parcialmente Solúvel, I = Insolúvel
 Fonte: dados da pesquisa.

Figura 29 – Solubilidade das amostras de CEQ e QT purificada em diferentes pH a 25 °C

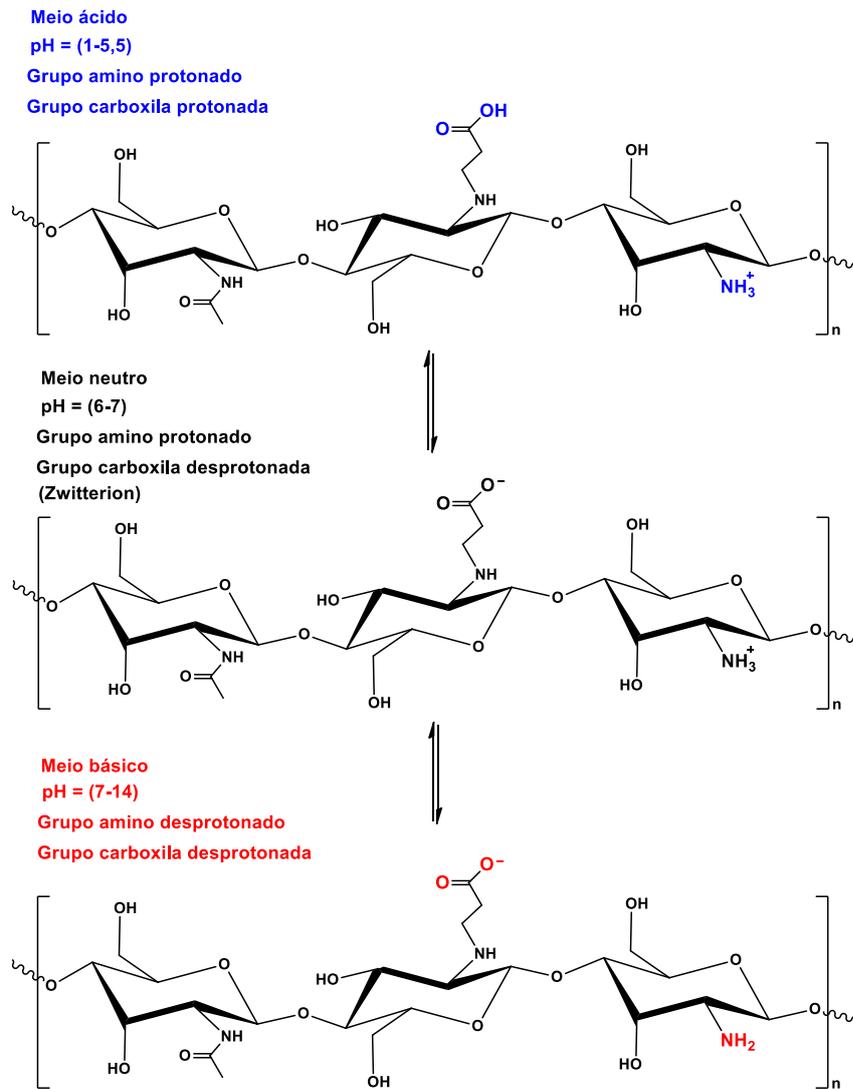


Fonte: dados da pesquisa.

Por outro lado, a CEQ apresenta solubilidade em toda a faixa de pH (1-14). A carboxietilquitosana contém o grupo carbonila ($-\text{COOH}$) que aumenta sua solubilidade em água. Além disso, a presença de $-\text{NH}_2$ e $-\text{COOH}$ na mesma molécula faz com que o CEQ reaja como zwitterion e aumente sua solubilidade. Como observado na Figura 30, em valores baixos de pH (1-4), a CEQ contém COOH e NH_3^+ (protonados), em valores de pH 7 o grupo $-\text{COOH}$ perde o próton para NH_2 e forma $-\text{NH}_3^+$ e $-\text{COO}^-$ (zwitterion) enquanto a QT e em valores altos de pH contém COO^- e NH_2 (desprotonado) (IBRAHIM; MOSTAFA; KANDILE, 2020; SASHIWA *et al.*, 2003).

Portanto, o aumento dos grupos carboxílicos na CEQ a deixa solúvel em uma ampla faixa de valores de pH com GS = 40,5.

Figura 30 – Protonação e desprotonação dos grupamentos aminos e carboxietil em diferentes valores de pH



Fonte: próprio autor.

Figura 31 - Aparência macroscópica das soluções de CEQ comparadas à da quitosana não modificada (todas nas concentrações de 2,0 % m/v)



Fonte: dados da pesquisa.

Com o aumento da solubilidade em ampla faixa de pH (1-14), além de sua biocompatibilidade, não toxicidade e atividade antibacteriana, a carboxietilquitosana se torna uma excelente candidata na preparação de materiais para aplicações biomédicas. Comparando com outros métodos existentes na literatura, a modificação com ácido acrílico é considerada menos danosa ao meio ambiente, pois dispensa a utilização de solventes orgânicos e é considerada uma reação verde (IBRAHIM; MOSTAFA; KANDILE, 2020; LI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2016).

4.3 Caracterização das nanopartículas do vidro bioativo (VB)

4.3.1 Análise da composição química por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES)

A composição química (em %mol) das nanopartículas de vidro bioativo foi sintetizada pelo processo sol-gel e estabilizadas a 650 °C. As amostras foram analisadas através da técnica de fusão do metaborato de lítio e ICP-OES. Essa análise é fundamental para compreender e correlacionar a sua estrutura com sua composição. Os resultados obtidos estão na Tabela 8, juntamente com as composições nominais das amostras.

Tabela 8 – Composição química nominal e composição química obtida através de ICP-OES das partículas de vidro obtidas

Amostra	Composição nominal (%mol)			Composição ICP-OES (%mol)		
	SiO ₂	CaO	P ₂ O ₅	SiO ₂	CaO	P ₂ O ₅
VB	80	16	4	89,9	9,5	<1,0

Fonte: dados da pesquisa.

Observando a Tabela 8, vemos as diferenças entre as composições nominais e as obtidas por ICP-OES. A fim de obter o precipitado da reação e, conseqüentemente, as partículas de vidro bioativo, são empregados os processos de filtragem e lavagem, os quais têm a capacidade de eliminar uma porção dos reagentes e precursores do meio, resultando na diminuição dos níveis de determinados componentes nas amostras (TSIGKOU *et al.*, 2014).

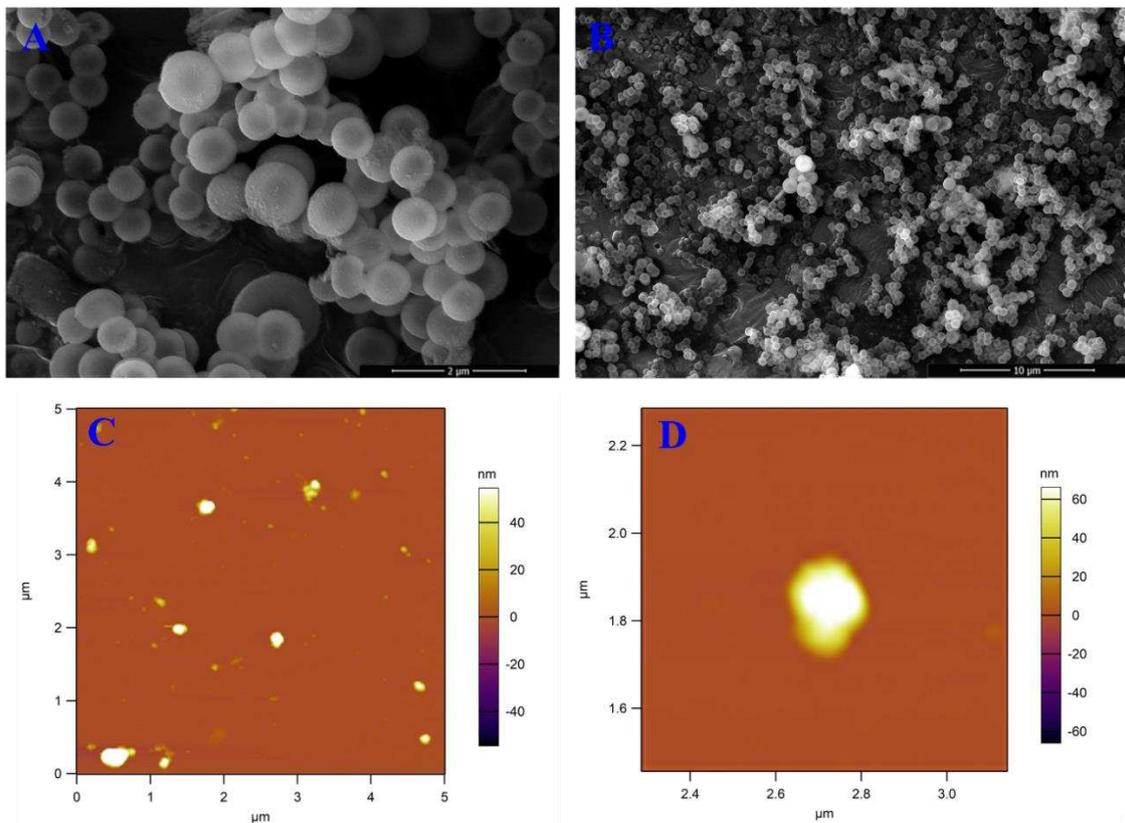
Ao considerar o conteúdo de P₂O₅ na amostra em questão, é possível inferir que o precursor de fósforo (TEP) foi introduzido em uma quantidade relativamente reduzida em comparação com os outros reagentes. Além disso, visto que o TEP é um composto que reage de forma mais lenta em comparação com o TEOS (precursor de silício), isso pode ter influenciado sua incorporação na estrutura da rede, contribuindo assim para a presença de menores concentrações de P₂O₅ nos vidros sintetizados (BARRIONI *et al.*, 2017).

No presente estudo, as amostras obtidas não apresentaram quantidades significativas de P₂O₅ (Tabela 8). Apesar disso, estudos relatam que o fosfato no sistema ternário não é um componente essencial para a bioatividade e que vidros do sistema binário (SiO₂:CaO) apresentam bioatividade tanto *in vivo* quanto *in vitro* (EBISAWA; OHURA, 1990; JONES *et al.*, 2007; LABBAF *et al.*, 2011).

4.3.2 Avaliação das propriedades morfológicas e texturais das nanopartículas

A Figura 32 (A e B) mostra as morfologias das partículas que foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA) na Figura 32 (C e D). Pode-se notar nas imagens que todas as amostras apresentaram uma morfologia esférica e não foram observadas diferenças morfológicas entre os grupos das nanopartículas. Estudos mostraram que comparando às partículas de forma irregular, as esféricas possuem melhores propriedades físico-químicas e biológicas (ARCOS; PORTOLÉS, 2023). Além disso, considerando as aplicações no processo de regeneração do tecido ósseo e sua utilização como um hidrogel injetável, o formato esférico auxilia numa melhora da injetabilidade do material, por terem melhores propriedades de fluxo (MOREIRA *et al.*, 2016).

Figura 32 - Imagens das nanopartículas de vidro bioativo obtidas por MEV (A) e (B) e AFM (C) e (D)



Fonte: dados da pesquisa.

Além da morfologia, o tamanho e a dispersão das partículas foram avaliados através das técnicas de DLS, MEV e AFM (Tabela 9). A diferença de tamanho observada entre o DLS e as outras técnicas podem ser atribuídas ao fato de que essa técnica mede o raio hidrodinâmico, o que também considera os aglomerados presentes. Nesse caso, pode-se constatar que os

resultados obtidos das imagens de MEV são mais próximos dos tamanhos reais das partículas avaliadas (as avaliações realizadas por AFM possuem valores dentro da faixa obtida por MEV), assim através das análises obtidas as partículas são classificadas quanto a sua escala de nanométrica (HOO *et al.*, 2008; TSIGKOU *et al.*, 2014).

Tabela 9 - Comparação dos diâmetros das nanopartículas de vidro bioativo obtidos pelas técnicas DLS, MEV e AFM e os valores de potencial zeta

Amostra	Diâmetro médio DLS (nm)	Diâmetro médio MEV (nm)	Diâmetro médio AFM (nm)	Potencial Zeta (mV) (pH=7; 25 °C)
VB	250 ± 30	138 ± 29	169 ± 67	-16,2 ± 1,3

Fonte: dados da pesquisa.

Em comparação às micropartículas, as nanopartículas representam uma opção mais atraente para a regeneração de tecidos, especialmente em tecidos duros, devido ao fato de que quanto menor o seu tamanho, maior é a sua área superficial (dentro da classe dos compósitos). Isso as torna ideais para a injeção em defeitos ósseos ou para a incorporação em uma matriz polimérica na síntese dos hidrogéis injetáveis (HU *et al.*, 2014; LABBAF *et al.*, 2011).

Outra importante avaliação realizada foi a medida do potencial zeta (ζ), os resultados mostraram que todas as partículas apresentam carga negativa em suas superfícies, conforme resultados apresentados na Tabela 9. Essas são relacionadas aos grupos hidroxilas presentes nas superfícies das amostras e que levam a uma carga negativa em pH acima do ponto isoelétrico (PI) (EL-FIQI *et al.*, 2012).

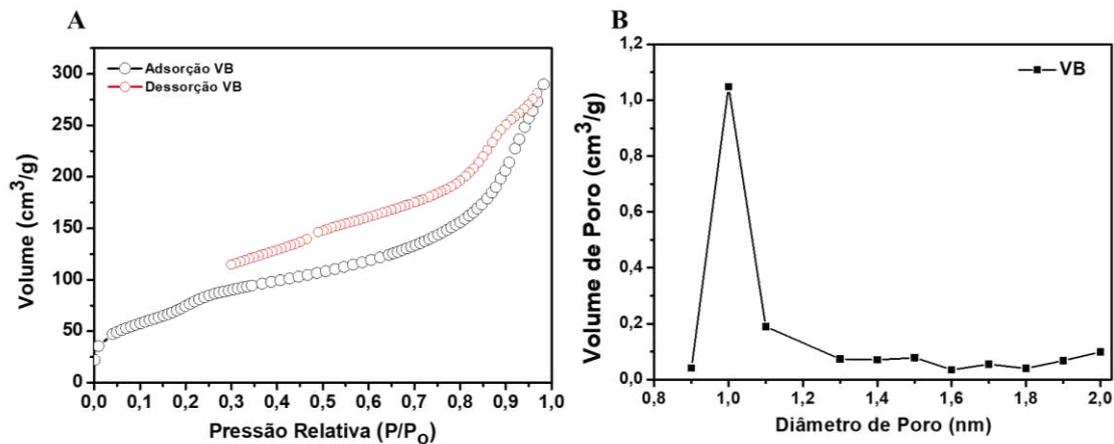
Mosqueira *et al.* (2021) sintetizaram vidro bioativo utilizando a rota sol-gel e mostraram que partículas com valores baixos de potencial ζ , normalmente na faixa entre 2 mV e - 5 mV, tendem a coagular ou flocular e que uma boa estabilidade é obtida quando o potencial ζ está próximo 30 mV em módulo (HONARY; ZAHIR, 2013). Em seus estudos, todas as partículas de vidro bioativo contendo ou não SrO apresentaram valores de potencial zeta entre 17,33 e 22,09 (valores bem próximos encontrados em nosso estudo) e apresentaram uma boa estabilidade, o que é desejado principalmente para aplicações terapêuticas.

4.3.3 Propriedades texturais das nanopartículas obtida por Brunauer-Emmett-Teller (BET)

As características dos poros das nanopartículas foram investigadas a partir das isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio pelo ensaio Brunauer-Emmett-Teller (BET). Na

Figura 33 são mostradas as isotermas de adsorção/dessorção de N₂ e as curvas de distribuição de tamanho de poro derivadas da dessorção das nanopartículas produzidas (os valores estão apresentados na Tabela 10).

Figura 33 - Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio (A) e distribuição de tamanhos de poros (B) (algoritmo BET derivado das curvas de dessorção) das nanopartículas de VB



Fonte: dados da pesquisa.

Como mostrado na Figura 33, foi identificado isoterma do tipo IV, que é característica de materiais mesoporosos (2-50 nm) e histereses do tipo H3 que estão associadas a mesoporos em forma de fenda (THOMMES *et al.*, 2015; WANG; PAN; CHEN, 2019) logo o diâmetro médio de poros encontrado está dentro da faixa mesoporosa mencionada.

Trabalhos relatados na literatura mostram que vidros com estruturas mesoporosas apresentam atrativas respostas bioativas, com grande potencial para diversas aplicações no campo biomédico (SEPULVEDA; JONES; HENCH, 2001), já que essa estrutura permite a adsorção de agentes biológicos, aprimorando a resposta biológica (GUNAWIDJAJA *et al.*, 2012). A área superficial específica e o diâmetro de poros obtidos pelo método BET foram 257,7 m² g⁻¹ e 6,95 nm, respectivamente.

Tabela 10 - Propriedades texturais obtidas pelos métodos BET para as nanopartículas de VB

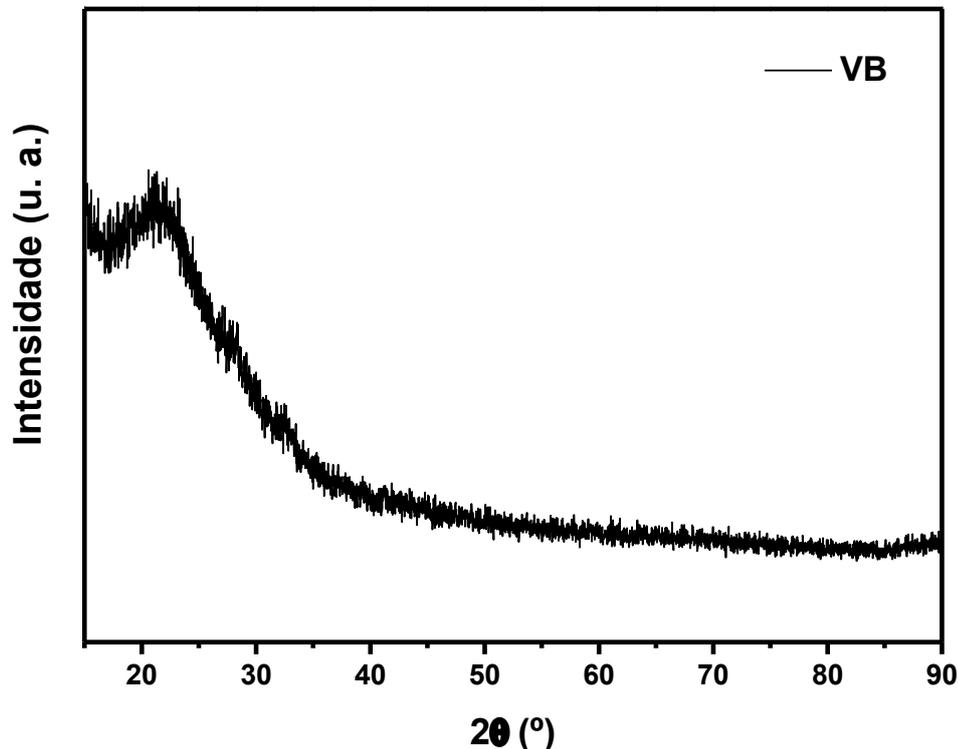
Amostra	Área superficial específica (m ² g ⁻¹)	Volume de poros total (cm ³ g ⁻¹)	Diâmetro de poros médio (nm)
VB	257,7	0,44	6,95

Fonte: dados da pesquisa.

4.3.4 Análise por difração de raio X (DRX)

O padrão de DRX das nanopartículas de vidro bioativo é apresentado na Figura 34.

Figura 34 - Padrão de DRX para as nanopartículas de vidro bioativo (VB)



Fonte: dados da pesquisa.

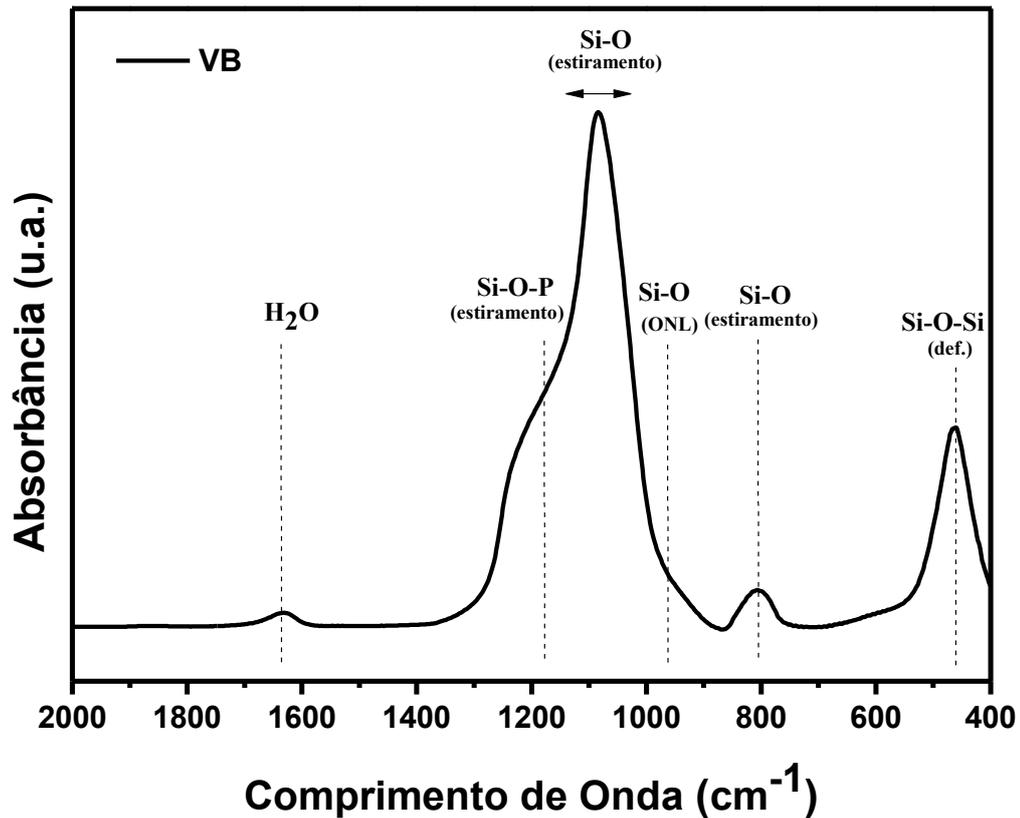
O difratograma das nanopartículas de vidro bioativo é caracterizado por um halo amplo e difuso, com 2θ na faixa de 15-35°, que corresponde à sílica amorfa (ALINE *et al.*, 2014). A ausência de picos de difração indica que a temperatura de tratamento térmico empregada (450 °C) na síntese não provocou cristalização do material. O tratamento térmico realizado em temperaturas entre 300-700°C tem sido empregado na síntese de nanopartículas de vidro bioativo, a fim de evitar sinterização do material.

Assim, são gerados materiais principalmente amorfos, sendo estes preferidos na aplicação biomédica devido à sua maior bioatividade em comparação com materiais cristalinos. (ALINE *et al.*, 2014; BARRIONI *et al.*, 2017).

4.3.5 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) para as nanopartículas de vidro bioativo

A Figura 35 apresenta o espectro de FTIR das nanopartículas estudadas.

Figura 35 - Espectros de FTIR obtido para as amostras de vidro bioativo (VB)



Fonte: dados da pesquisa.

As principais bandas de vibração presentes nesses espectros são típicas de vidros bioativos. A banda na região entre 450-470 cm^{-1} pode ser relacionada a deformação angular de ligações Si-O-Si de estruturas amorfas (EL-KADY; ALI, 2012; PIRAYESH; NYCHKA, 2013).

As absorvâncias 725 e 810 cm^{-1} estão relacionadas ao estiramento simétrico Si-O, enquanto o estiramento assimétrico dessas ligações pode ser atribuído às bandas na faixa entre 1000–1200 cm^{-1} (BARRIONI *et al.*, 2019; MOREIRA *et al.*, 2016). Em 965 cm^{-1} é possível observar uma absorvância com uma intensidade fraca e que ocorre devido às ligações Si-O contendo um oxigênio não ligante (Si-O-ONL) por tetraedro de SiO_4 (BARRIONI *et al.*, 2017). Por fim, observa-se a banda de absorvância em 1635 cm^{-1} que é atribuída à água molecular adsorvida na superfície do vidro (BARRIONI *et al.*, 2019).

4.4 Caracterização dos hidrogéis

Os hidrogéis foram preparados pela combinação das soluções GGOx + CEQ + VB. Como evidenciado em outros trabalhos, os hidrogéis injetáveis baseados apenas em polímeros naturais sofrem com uma baixa rigidez, logo a incorporação de nanopartículas orgânicas, nanopartículas de vidro bioativo, na matriz do hidrogel foi uma forma de melhorar as propriedades mecânicas através da criação de um material compósito. A escolha das nanopartículas reside em suas propriedades biocompatíveis, bioativas e pelo fato de que são poucos os trabalhos até o presente momento que relatam a utilização das nanopartículas como agente de reforço para hidrogéis injetáveis (DE FRANCE *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018; WANG; CHEN; CHEN, 2017). A maioria dos trabalhos utiliza outros agentes de reforços, como nanocristais de celulose, nanocristais de quitina e nanopartículas de prata.

4.4.1 Análise reológica dos hidrogéis

Com o intuito de escolher a melhor concentração de vidro bioativo nos hidrogéis, analisou-se o efeito da adição das nanopartículas em diferentes concentrações nas propriedades mecânicas utilizando a análise reológica. A introdução de nanopartículas vem sendo bastante estudada nos últimos anos, pois é uma das melhores formas de melhorar as propriedades mecânicas dos hidrogéis.

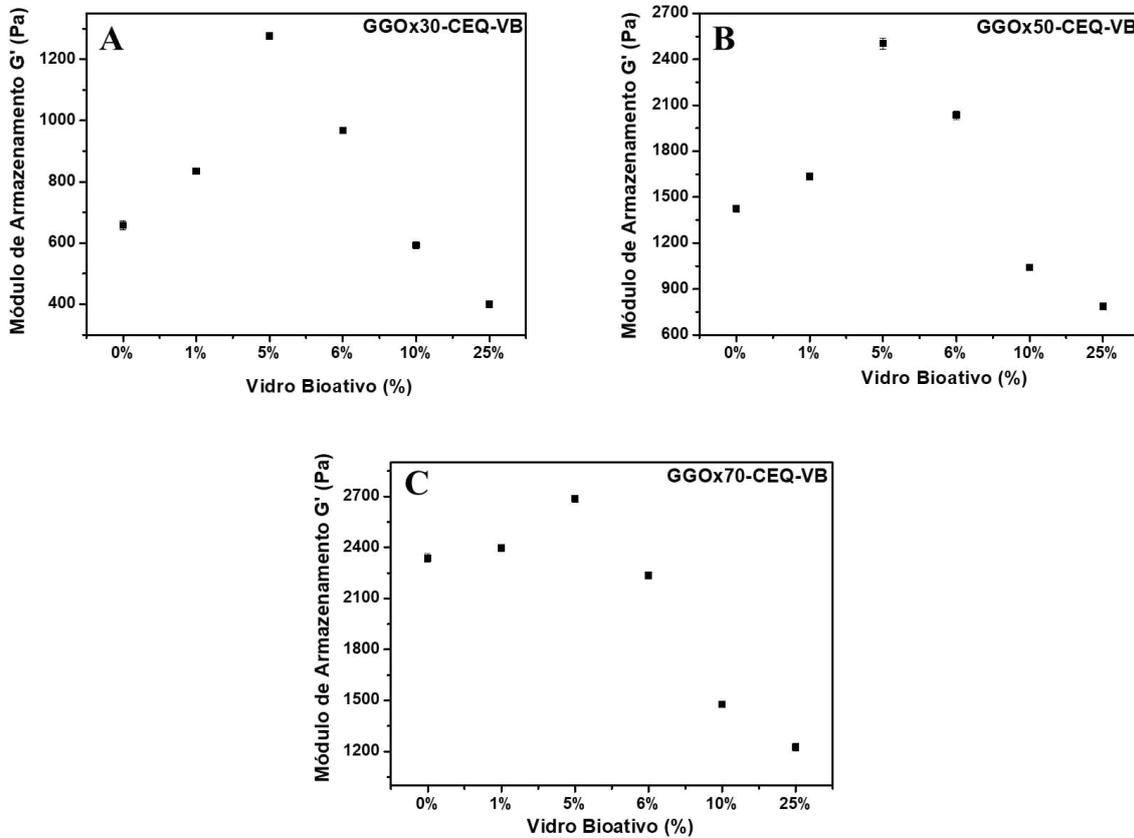
De acordo com Hartmann *et al.* (2019), os compósitos poliméricos consistem em pelo menos dois componentes: a matriz polimérica e o reforço (não) polimérico. Esta abordagem tem a vantagem de poder combinar propriedades para construir um material com características diferentes dos materiais de partida.

Na Figura 36 é mostrada a interação entre os hidrogéis com diferentes porcentagens de agente de reforço e o módulo de armazenamento (Pa), logo quando comparamos todas as formulações de 1% a 5% de VB é possível observar um aumento do módulo de armazenamento, indicando que houve um aumento na resistência mecânica e que ocorreu uma interação eficiente entre o VB com a matriz polimérica.

Contudo, esse aumento nas propriedades não foi muito significativo, principalmente quando comparada com o trabalho de Moreira *et al.* (2016). A interação matriz/agente de reforço no presente trabalho é física, ou seja, o agente de reforço não se liga quimicamente à matriz. No caso do trabalho mencionado, as nanopartículas adicionadas à

matriz atuam simultaneamente como agentes de reforço/reticulação e isso pode contribuir para uma melhoria mais significativa das propriedades mecânicas.

Figura 36 – Módulo de armazenamento obtido para as amostras de hidrogéis com vidro bioativo (VB) em diferentes porcentagens. (A) Hidrogel GGOx30-CEQ-VB; (B) GGOx50-CEQ-VB; (C) GGOx70-CEQ-VB.



Fonte: dados da pesquisa.

Analisando todas as formulações de 6% a 25% de VB, os resultados se mostraram contrários ao percebido dos valores anteriores, com uma diminuição significativa do módulo de armazenamento (Pa), então pode-se inferir que existe um ponto crítico para as quantidades de carga adicionada à matriz.

Domingues *et al.* (2015), também observaram resultados semelhantes trabalhando com nanocristais de celulose. Os autores apontaram para a hipótese de que com altas quantidades de agente de reforço, possa haver um bloqueio estérico e o processo de reticulação entre os polímeros é dificultado. Outras possibilidades seriam a autoagregação dos nanocristais (formação de aglomerados) (ZENG *et al.*, 2012) ou a de um mecanismo competitivo, em que os nanocristais interagem por meio de ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila de

cadeias adjacentes bloqueando a estrutura e diminuindo o número de ligações covalentes entre as cadeias.

Com isso a formulação escolhida para ser utilizada em todo o trabalho foi aquela contendo a concentração de 5% de VB, a qual apresentou os maiores valores de módulo de armazenamento (superiores a 1000 Pa). Logo, o presente trabalho terá formulações com VB (5%) e sem VB (branco).

4.4.2 Tempo de gelificação para os hidrogéis com e sem vidrobioativo (VB)

Com a finalidade de investigar a influência das nanopartículas de VB (%) na formação dos géis, foi realizado um ensaio reológico com GG oxidada e CEQ em suas diferentes formulações. A Figura 37 apresenta a evolução dos módulos de G' e G'' com o tempo.

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 (no corpo da seringa ou na agulha), ao mesmo tempo que uma gelificação lenta ocasionaria uma disseminação dos percusores do hidrogel para longe do local de injeção (LÜ *et al.*, 2015).

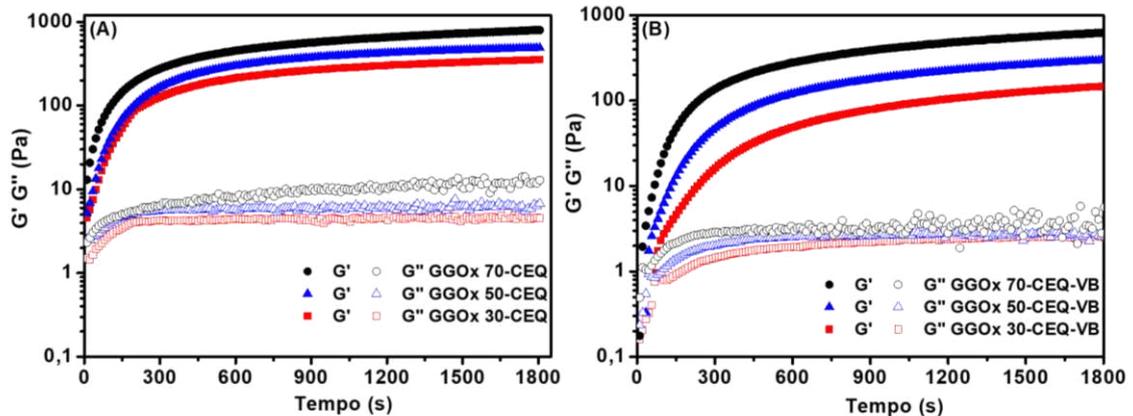
Existem diferentes métodos para determinação do tempo de gelificação (t_{gel}), sendo um dos mais comuns, o método de inversão de tubo, em que se inverte o tubo em intervalos regulares de tempo a uma temperatura constante, em banho termostático até nenhuma fluidez ser observada (PONTREMOLI *et al.*, 2018). Outro método é o da barra magnética, com formação de glóbulo visível a olho nu (DORRAJ; MOGHIMI, 2015), além do acompanhamento por análise em reômetro (crossover entre G' e G'') (DOMINGUES *et al.*, 2015). Tendo em vista a aplicação de hidrogéis injetáveis como biomateriais, os testes acima foram realizados a 37 °C (simulando a temperatura do corpo humano).

Neste trabalho, o t_{gel} foi determinado utilizando análise reológica, no qual analisou-se os módulos G' e G'' durante o processo de gelificação.

A Figura 37 apresenta a comparação entre o hidrogel sem VB (A) e aquele com 5% de VB (B). A princípio, a mistura de ambas as soluções se comportou como um fluido viscoso (sol), em que G'' era maior que G' . Durante o processo de formação da base de *Schiff*, tanto G' quanto G'' evoluíram como resultado do processo de reticulação. No entanto, G' aumentou mais

rápido que G'' e podemos observar um ponto de cruzamento que é definido como o tempo de gel (SARKER *et al.*, 2014).

Figura 37 - Evolução do módulo de armazenamento (G') e de perda (G'') com o tempo para GGOx-CEQ-VB. Sem VB (A) e com VB (B) (5%). O tempo de cruzamento G' e G'' é denominado como crossover t_{gel} (ponto de gelificação)



Fonte: dados da pesquisa.

Na Figura 37 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 da formulação GGOx 70-CEQ-VB mostrando valores de G' superiores ao G'' no início das análises, indicando que a gelificação ocorreu antes mesmo de se inicializar a análise no reômetro.

A Tabela 11 mostra os valores e a influência do grau de oxidação nas formulações, pois o aumento do grau de oxidação de 30 a 70% reduziu consideravelmente os valores de t_{gel} de 97 para 47 segundos e houve um aumento nos valores de G' de 369,3 Pa para 791,2 Pa, indicando que uma maior quantidade de grupamentos aldeídicos proveniente da goma guar oxidada influencia diretamente no aumento da reticulação e por consequência na redução dos valores de t_{gel} .

Tabela 11 - Tempo de gelificação para os hidrogéis (concentração de 2% (m/v) e temperatura de 37 °C) formulados a partir de GGOx e CEQ

Amostras	^a t _{gel} (s)	^b G' (Pa)
GGOx 30-CEQ	57	369,3
GGOx 30-CEQ-VB	97	136,8
GGOx 50-CEQ	37	510,1
GGOx 50-CEQ-VB	76	322,4
GGOx 70-CEQ	----	791,2
GGOx 70-CEQ-VB	47	621,9

^a t_{gel} determinado reologicamente.

^b Valores referentes ao módulo de armazenamento G'.

Fonte: dados da pesquisa.

Pode-se observar também que a adição do agente de reforço (VB) levou à diminuição do tempo de gelificação (t_{gel}) para todos hidrogéis, isso é devido principalmente a hipótese de que com altas quantidades de agente de reforço, possa haver um bloqueio estérico e o processo de reticulação entre os polímeros é dificultado, reduzindo, assim, o t_{gel} como observado.

Gao *et al.* (2019) desenvolveram hidrogéis à base de alginato de sódio oxidado com di-hidrazida de ácido adípico modificado com ácido poliglutâmico como agente de reticulação com potencial aplicação na engenharia de tecido ósseo. Nesse estudo, os autores observaram um aumento do tempo de gelificação a partir do aumento da quantidade de vidro bioativo, tendo uma variação de < 1 min para o hidrogel sem o VB até 8 min para o hidrogel contendo 1,5% de VB, isso é devido principalmente ao impedimento estérico ocasionado pela maior quantidade de VB.

Reakasame *et al.* (2020) utilizaram alginato de sódio oxidado com gelatina através da reticulação química base de *Schiff* reforçado com bioglass em diferentes concentrações (0,1 e 0,5% m/v) e observaram uma diminuição no tempo de gelificação de 40 para 5 minutos nos materiais que não continham bioglass para os que continham. Essa observação é importante, pois mostra que os agentes de reforços modulam as propriedades dos hidrogéis.

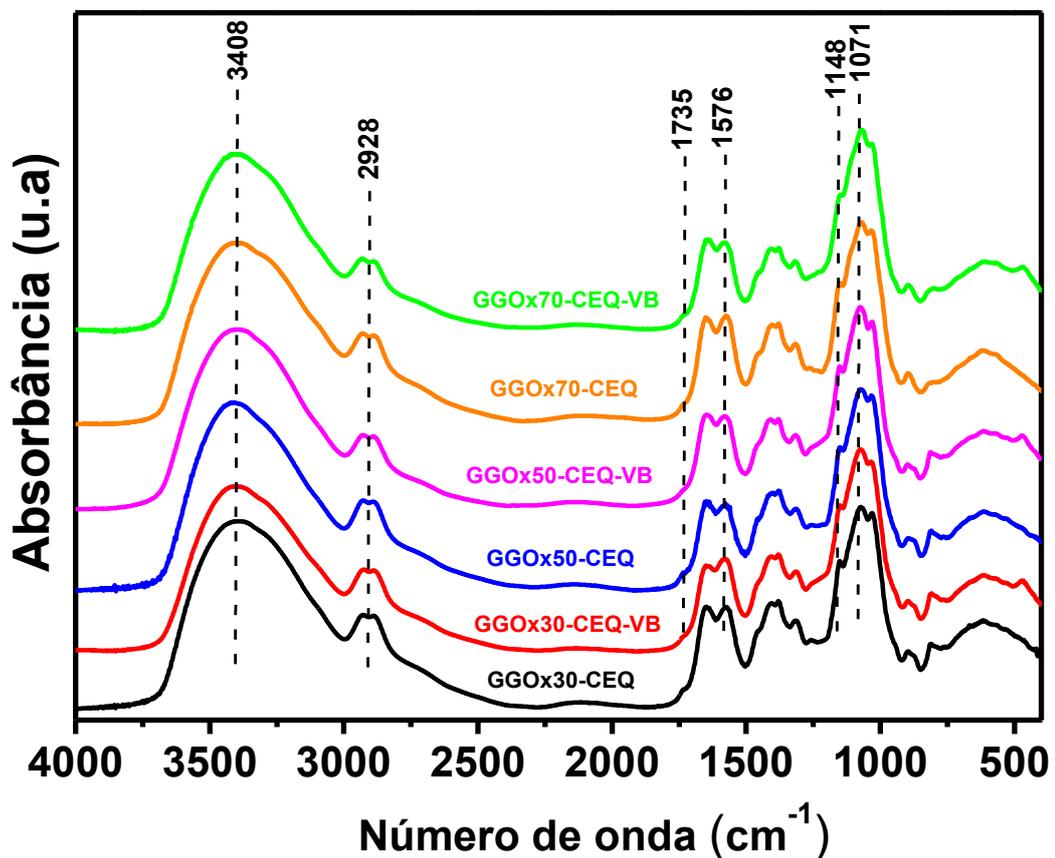
Os valores de t_{gel} nesse trabalho ocorreram em sua maioria entre 1 e 5 min, mostrando que todas as formulações podem ter aplicações biomédicas como suportes porosos e também como hidrogéis injetáveis (FATHI *et al.*, 2014).

4.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) para os hidrogéis

A estrutura química dos hidrogéis com e sem VB foi investigada por meio dos espectros de FTIR. Para isso as amostras foram previamente liofilizadas. Os espectros dos hidrogéis preparados podem ser vistos na Figura 38.

Todos os espectros apresentam bandas muito semelhantes, com poucas diferenças entre si. Inicialmente, observa-se nos espectros das matrizes porosas bandas de absorção provenientes dos polissacarídeos modificados, anteriormente caracterizados.

Figura 38 - Espectros de FTIR obtido para as amostras dos hidrogéis em suas diferentes formulações



Fonte: dados da pesquisa.

Foram observadas bandas comuns dos materiais precursores desses hidrogéis, como as bandas em 3408 e 1071 cm^{-1} atribuídas ao estiramento O-H e estiramento C-O-C de ligação glicosídica oriunda da goma guar 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 de base de *Schiff* entre os grupos aldeídos provenientes da GGOx 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 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 GGOx, sugerindo que esses grupos foram utilizados para a reação de reticulação.

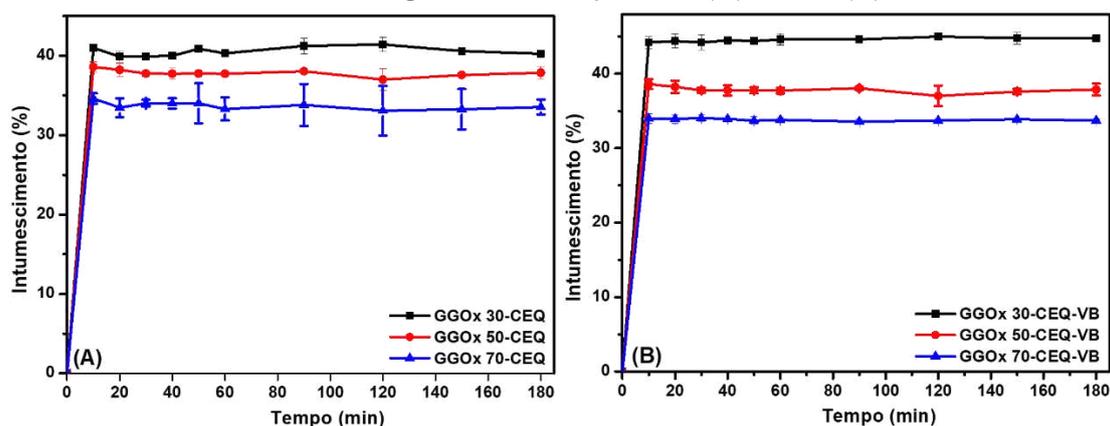
Não foram observadas diferenças significativas nos espectros de hidrogéis com e sem VB, além disso, a baixa concentração de vidro bioativo nos hidrogéis também pode dificultar a detecção das bandas referentes ao material inorgânico (MOREIRA *et al.*, 2016).

4.4.4 Avaliação da capacidade de absorção (intumescimento) dos hidrogéis

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 hidrogéis 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 39 apresenta o intumescimento (PBS foi usado como um meio para simular as condições fisiológicas) dos géis de GGOx-CEQ em diferentes graus de oxidação sem (A) e com (B) VB.

Figura 39 - Intumescimento dos hidrogéis por três horas em PBS (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4), em diferentes graus de oxidação sem (A) e com (B) VB



Fonte: dados da pesquisa.

As curvas de intumescimento dos hidrogéis, como evidenciado na Figura 39, apresentaram valores e uma tendência muito parecidas, em que inicialmente todos os hidrogéis mostraram nos primeiros minutos (0 a 10 minutos) um valor de intumescimento abrupto, seguido de um platô controlado até o final do experimento (10 a 180 minutos) quando o equilíbrio foi atingido. Esse perfil mostra-se importante, pois previne a perda de fluídos e de nutrientes corporais dentro do tempo do experimento, quando aplicado como hidrogel injetável ou *scaffolds* (BLAŽIC; MARUŠIĆ; VIDOVIĆ, 2023).

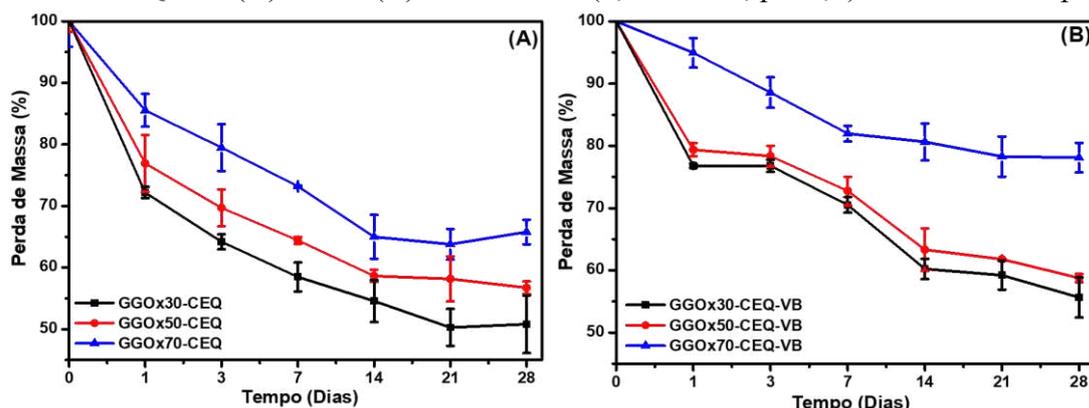
O resultado de intumescimento está de acordo com a análise de porosidade. Os hidrogéis de GGOx 30-CEQ com e sem VB foram os que mais intumesceram, logo é observado que quanto menor grau de oxidação o intumescimento médio aumenta, isso pode ser explicado pela estrutura entrelaçada dos hidrogéis. Assim, possivelmente o maior grau de oxidação da GG levará ao aumento do número de grupos aldeídos disponíveis para reagir com os grupos amina da carboxietilquitosana, proporcionando uma elevada quantidade de ligações cruzadas (formação de base de *Schiff*), podendo assim levar a uma menor capacidade de reter elevadas quantidades de água.

A introdução das nanopartículas de vibriobioativo (VB) levou a uma pequena diminuição nos valores de intumescimento, isso pode estar relacionado à formação de uma estrutura mais coesa, com a qual o VB pode interagir com as cadeias adjacentes do polissacarídeo através da formação de ligação de hidrogênio, levando assim a uma diminuição do tamanho dos poros e por consequência a um menor intumescimento do hidrogel, ou pode-se também estar relacionado a um impedimento estérico acarretado pelas partículas que ocupam os poros do hidrogel, ocasionando um impedimento do PBS de adentrar na estrutura.

4.4.5 Avaliação da perda de massa (degradação) in vitro dos hidrogéis

A Figura 40 apresenta a cinética de degradação *in vitro* dos hidrogéis de GGOx-CEQ com e sem VB em diferentes graus de oxidação durante 28 dias de experimento, no qual é possível observar uma perda brusca de massa nos primeiros dias, seguido de uma estabilização nos dias finais.

Figura 40 – Cinética de degradação *in vitro* das diferentes formulações dos géis de GGOx-CEQ sem (A) e com (B) VB em PBS (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4) a 37 °C e 100 rpm



Fonte: dados da pesquisa.

A degradação *in vitro* nos diferentes graus de oxidação da GGOx com e sem VB foi conduzida em meio salino, com o intuito de examinar a perda de massa dos hidrogéis a 37 °C e agitação de 100 rpm. Como mostrado na Figura 40, os hidrogéis sofreram perda de massa considerável nos primeiros 14 dias, seguida por uma degradação mais moderada ao longo do tempo estudado de 28 dias, confirmando assim que as diferentes formulações de GGOx-CEQ com e sem VB podem ser degradadas hidroliticamente.

Tabela 12 – Perda de massa dos hidrogéis a partir dos experimentos de cinética de degradação em PBS (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4) a 37 °C e 100 rpm

Amostras	Perda de Massa (%)
GGOx 30-CEQ	49,2 ± 0,3
GGOx 30-CEQ-VB	44,3 ± 0,5
GGOx 50-CEQ	43,2 ± 0,2
GGOx 50-CEQ-VB	41,2 ± 0,1
GGOx 70-CEQ	34,2 ± 0,9
GGOx 70-CEQ-VB	21,9 ± 0,4

Fonte: dados da pesquisa.

Podemos observar na Tabela 12 que a amostra GGOx 30 sem e com VB foi a que se degradou de forma mais significativa, assim, a degradação está diretamente relacionada à quantidade de pontos de reticulação formados através das ligações iminas (base de *Schiff*), pois as formulações de GGOx 30-CEQ apresentaram um menor grau de reticulação como mostrado nos ensaios reológicos, resultando assim em um perfil com uma maior perda de massa (aproximadamente 49,2 e 44,3%) entre as formulações estudadas. No hidrogel formulado por GGOx 50-CEQ, que possui uma maior reticulação, ocorre uma maior degradação, média de

43,2 e 41,2% em sua massa. Já a formulação de GGOx 70-CEQ obteve valores de 34,2 e 21,9%, sendo o hidrogel que menos teve perda de massa, esse fato pode ser atribuído à quantidade de reticulação presente. Quanto maior o número de reticulação química, maior é a formação de base de *Schiff* (ligação imina), o que torna a degradação hidrolítica do material mais difícil. Isso ocorre porque à medida que o número de ligações cruzadas aumenta, o tempo necessário para a hidrólise dessas ligações também aumenta (LEE; BOUHADIR; MOONEY, 2000).

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

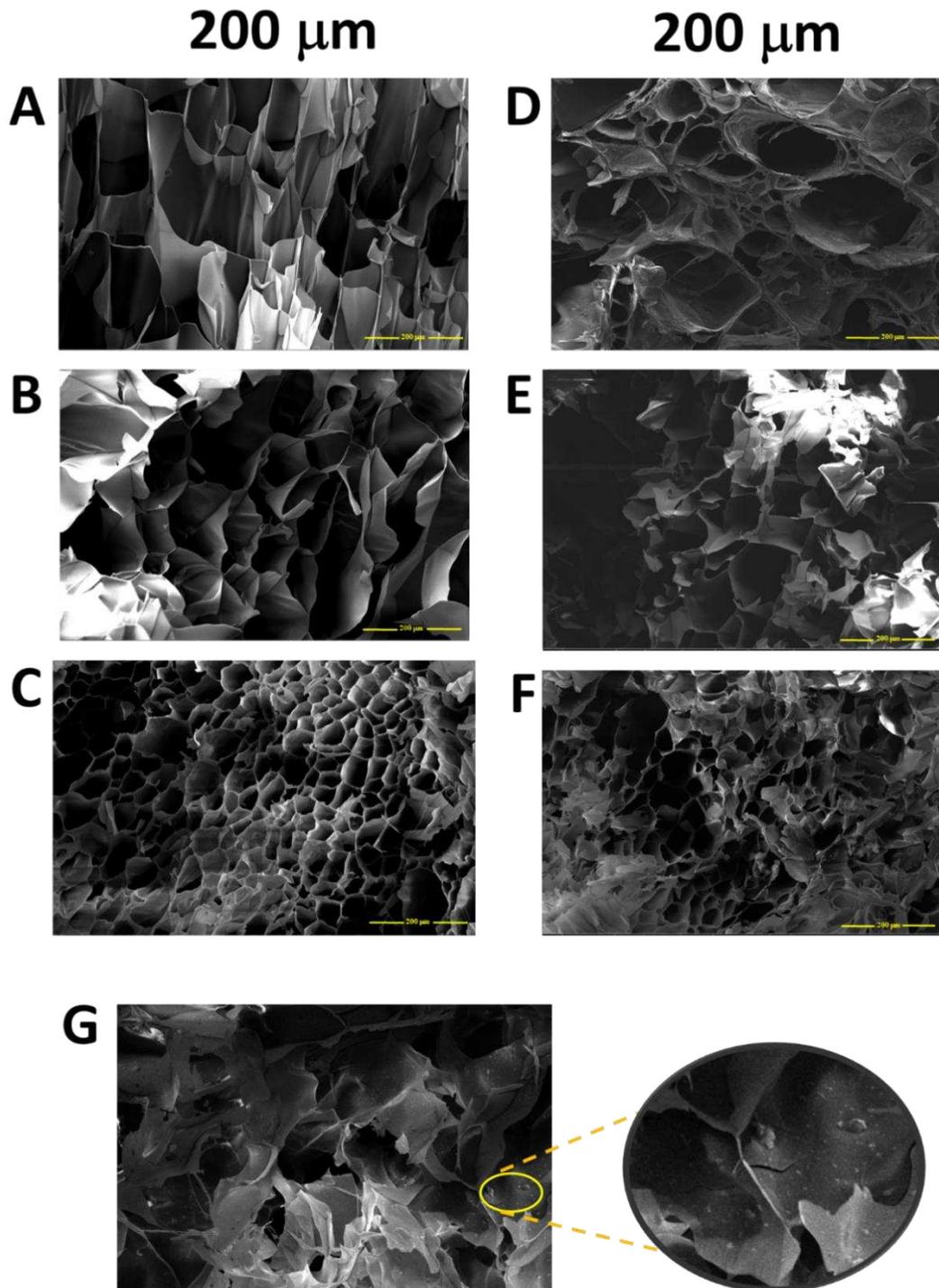
4.4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos hidrogéis

As morfologias dos hidrogéis injetáveis a partir dos géis de GGOx-CEQ com e sem VB foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 41), com géis obtidos pelo método *freeze-drying* (congelamento seguido de secagem por liofilização), o qual 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 hidrogéis de GGOx-CEQ com e sem VB são mostradas na Figura 41 (A-G).

Figura 41 – Microscopia eletrônica de varredura das amostras de GGOx 30-CEQ (A), GGOx 50-CEQ (B), GGOx 70-CEQ (C), GGOx 30-CEQ-VB (D), GGOx 50-CEQ-VB (E), GGOx 70-CEQ-VB (F) e GGOx 50-CEQ-VB (G) com zoom para evidenciar as nanopartículas de vidro (VB) na estrutura do *scaffolds*, todas as micrografias apresentam magnificação de 250x e escala de 200 μm



Fonte: dados da pesquisa.

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 GG, o qual é uma vantagem do método utilizado nesse experimento (*freeze-drying*) (AGUA *et al.*, 2018).

A partir das micrografias e da Tabela 13, percebe-se que ao aumentar o grau de oxidação da GGOx provoca-se uma diminuição do tamanho médio dos poros. O gel de GGOx 30-CEQ apresentou o maior tamanho médio de poros com valor de $356 \pm 16 \mu\text{m}$, possivelmente esse grau de oxidação 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 30% apresentaram menores valores de G' . Isto indica a formação de géis mais fracos e consequentemente com poucos pontos de reticulação. Apenas a partir do grau de oxidação da GGOx 50, que se obteve um gel com tamanho médio de $213 \pm 25 \mu\text{m}$, e GGOx 70 com média de $133 \pm 19 \mu\text{m}$, nos quais observou-se a formação de estruturas tridimensionais estáveis, com redes interconectadas.

Também é perceptível a inclusão do agente de reforço (VB) na estrutura do hidrogel (Figura 41G), pois essa adição resultou em uma ligeira redução no tamanho dos poros em todos os hidrogéis. Isso ocorre principalmente devido à hipótese de que em uma pequena quantidade de agente de reforço possa ocorrer um bloqueio estérico, tornando o processo de reticulação entre os polímeros mais difícil e, como consequência, diminuindo o tamanho dos poros, conforme observado.

Zhou *et al.* (2021b) sintetizaram hidrogéis injetáveis a partir de sulfato de condroitina oxidada e gelatina com nanopartículas de bioglass incorporadas na rede tridimensional do material e observaram valores entre 50 e 217 μm quando a concentração de bioglass é alterado, ficando dentro da faixa aceita de tamanho de poros.

Os valores de tamanho de poros obtidos neste estudo estão na faixa recomendada para aplicações gerais de engenharia de tecidos que está entre 50 e 400 μm . (CUI *et al.*, 2014; FOSS *et al.*, 2013).

Tabela 13 – Tamanho médio dos poros com n=50 medidos por Image J

Amostra	MEV (μm)
GGOx 30-CEQ	356 \pm 15
GGOx 30-CEQ-VB	346 \pm 9
GGOx 50-CEQ	213 \pm 25
GGOx 50-CEQ-VB	198 \pm 12
GGOx 70-CEQ	133 \pm 19
GGOx 70-CEQ-VB	123 \pm 5

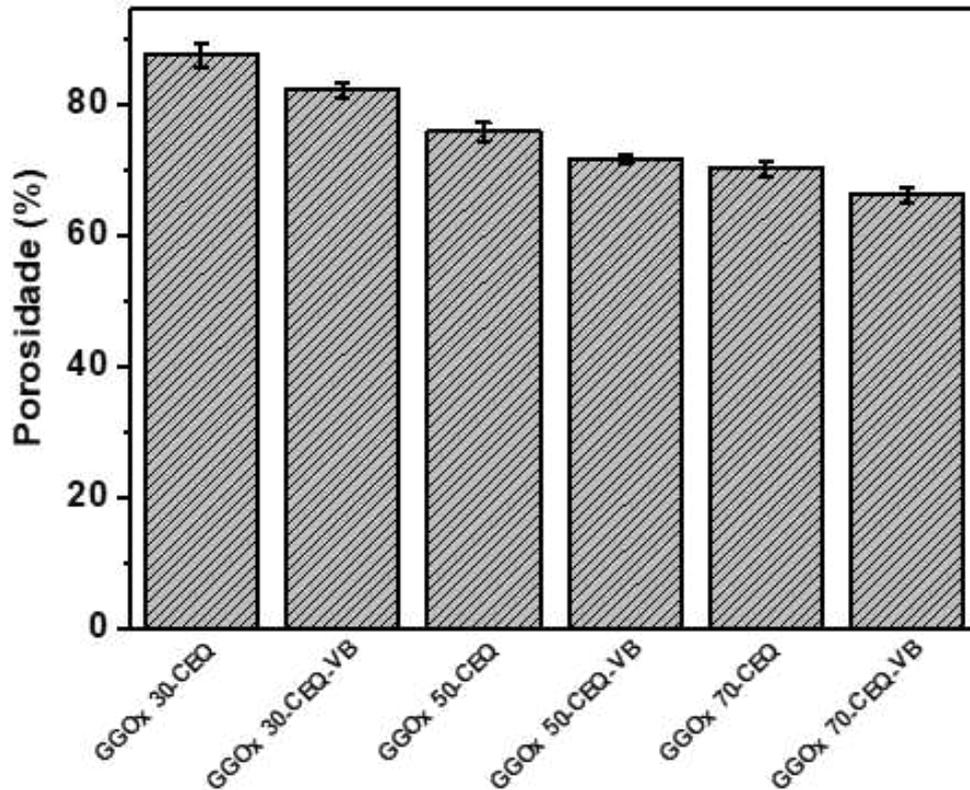
Fonte: dados da pesquisa.

4.4.7 Avaliação da porosidade dos hidrogéis

A porosidade e sua rede interconectada estão entre as propriedades mais importantes dos hidrogéis injetáveis na engenharia de tecidos, pois essa propriedade permite a penetração, crescimento e proliferação celular e a vascularização (PERSSON *et al.*, 2018; SARKER *et al.*, 2016). De acordo com Karageorgiou e Kaplan (2005), a porosidade é definida com a porcentagem de espaços vazios no sólido e é um dos principais parâmetros para a engenharia de tecidos no desenvolvimento dos biomateriais. Os poros das estruturas foram formados usando a técnica de liofilização, que envolve congelar o material a temperaturas muito baixas e, em seguida, submeter o material congelado a pressões reduzidas. Isso permite que a água presente no material sofra sublimação, originando assim os espaços vazios (poros) dentro dos hidrogéis (YANG *et al.*, 2017; HEIMBUCK *et al.*, 2019).

A Figura 42 mostra a porosidade dos géis de GGOx – CEQ com e sem VB realizado pelo método de infiltração em etanol e calculada pela Equação 9.

Figura 42 - Valores de porosidade, dos géis de GGOx-CEQ com e sem VB



Fonte: dados da pesquisa.

De acordo com a Figura 42 é possível observar que todos os hidrogéis produzidos, independente do teor de nanopartículas de VB, apresentaram baixos valores de porosidade, ficando entre 65 e 86%. Esses valores relativamente baixos são importantes para a manutenção da estrutura do hidrogel, uma vez que a porosidade está intimamente relacionada às suas propriedades mecânicas, pois a rigidez diminui à medida que a porosidade aumenta (ANNABI *et al.*, 2010).

Os hidrogéis com VB apresentaram valores de porosidade menores quando comparados com os sem VB, isso é devido principalmente as nanopartículas ocuparem volumes entre os poros dos *scaffolds* reduzindo assim sua porosidade. Sarker *et al.* (2016) obtiveram resultados semelhantes trabalhando com alginato oxidado e gelatina com diferentes concentrações de biovidro incorporados na estrutura para regeneração de tecido ósseo.

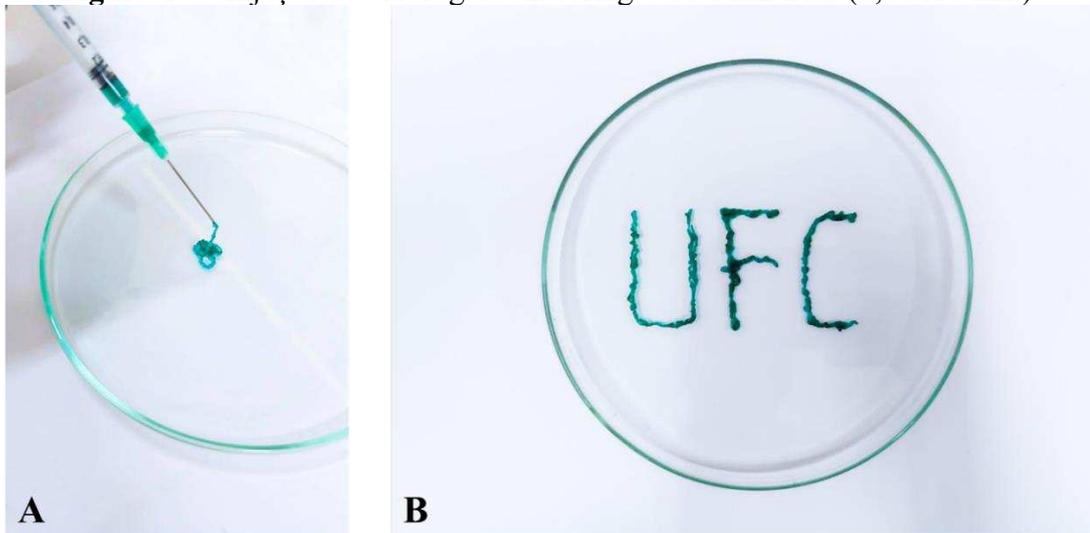
Esses valores estão de acordo com estudos anteriores que relataram que hidrogéis injetáveis acima de 50% de porosidade são ideais para aplicações em engenharia de tecidos. (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005; YOOK *et al.*, 2012).

4.4.8 Injetabilidade *in vitro*

Uma das questões associadas ao uso de hidrogéis injetáveis é sua capacidade de encapsular facilmente células e/ou fármacos em soluções precursoras de hidrogel (LI; RODRIGUES; TOMÁS, 2012). Essa qualidade está relacionada ao fato de que os precursores estão em estado líquido, permitindo assim sua administração por meio de uma injeção simples. A eficácia do procedimento de injeção depende da força aplicada ao êmbolo, da uniformidade do fluxo no bisel e da ausência de obstrução na cânula (CILURZO *et al.*, 2011). Essas características definem a injetabilidade de um material.

A injetabilidade dos hidrogéis com e sem nanopartículas de VB foi avaliada pela extrusão dos componentes através da cânula de uma seringa de 1 mL 26G (0,45x13 mm) (Figura 43). Este foi apenas um experimento qualitativo para avaliar a injetabilidade dos hidrogéis.

Figura 43 – Injeção dos hidrogéis em seringas de 1 mL 26G (0,45x13 mm)



Fonte: dados da pesquisa.

Para aplicações clínicas, é essencial determinar a quantidade de força necessária para a aplicação do êmbolo por meio de um teste denominado seringabilidade. Embora as soluções contendo nanopartículas de VB tenham demonstrado uma viscosidade substancialmente maior, os hidrogéis derivados delas puderam ser facilmente administrados. A incorporação das nanopartículas não comprometeu de forma significativa a capacidade de administração. O hidrogel conseguiu fluir sem interromper o fluxo e, após a administração, manteve sua forma não fluida de maneira espontânea como mostrado na Figura 43.

Li *et al.* (2023) em seus estudos, utilizando a formação de base de *Schiff* entre os polissacarídeos modificados carbometilquitosana e carboximetil celulose oxidada (com quatro

graus de oxidação diferentes 25, 50, 75 e 100%) com vidro bioativo incorporado na rede tridimensional dos hidrogéis, observaram uma boa injetabilidade dos seus materiais mesmo após a inserção do VB na matriz e que todos os géis passaram facilmente através da agulha utilizada, mantendo seu comportamento mesmo após a extrusão.

Lima *et al.* (2020) avaliaram uma excelente injetabilidade dos hidrogéis sintetizados a partir da combinação entre N-succinil quitosana e galactomana (*delonix regia*) oxidada reforçada com nanocristais de quitina em diferentes razões, embora as soluções apresentassem claramente uma viscosidade mais elevada, todos os hidrogéis preparados foram facilmente injetados e a adição das CNCs não comprometeram significativamente a injetabilidade.

Tendo em vista a natureza fluida dos hidrogéis antes da gelificação, pode-se inferir que eles podem ser administrados em defeitos de formato irregular e em locais de difícil acesso. Vale ressaltar que para aplicações clínicas de rotina, as agulhas de pequeno calibre são preferidas para reduzir os danos no local de aplicação (SAPORITO *et al.*, 2019) e, portanto, as condições utilizadas neste trabalho (agulha 26G) classificam os hidrogéis obtidos como tendo boa injetabilidade.

4.4.9 Avaliação da seringabilidade dos hidrogéis

O termo "seringabilidade" descreve a capacidade de um material ser liberado através de uma agulha. Para avaliar essa característica nas amostras, foi analisado a porcentagem de material que efetivamente fluiu da seringa. Até agora, não há um método quantitativo padrão para avaliar a seringabilidade e a injetabilidade de hidrogéis. Portanto, conduziu-se um teste de seringabilidade utilizando um dispositivo simples, seguindo uma abordagem semelhante àquela descrita por Alves *et al.* (2008). Embora existam apenas alguns estudos que tratam da avaliação da seringabilidade e injetabilidade de sistemas injetáveis, a análise desses parâmetros é crucial para estimar o desempenho da injeção do material.

Optou-se por utilizar uma agulha 21G^{1/4} neste estudo, uma escolha comum para a administração *in vivo* de substâncias similares. A Tabela 14 revela que todas as formulações alcançaram uma seringabilidade próxima de 100% com o tamanho de agulha (utilizando Equação 10) testada. A seringabilidade variou de $92,8 \pm 0,2$ % a $99,6 \pm 0,1$ % para agulha 21G^{1/4}. Esses resultados indicam que todas as formulações são capazes de atravessar facilmente uma agulha hipodérmica, demonstrando uma precisão notável na entrega do material.

Tabela 14 – Seringabilidade dos hidrogéis por uma agulha de 21G^{1/4} (25x0,8 mm)

Amostra	Seringabilidade (%)
	Agulha 21G ^{1/4} (25x0,8 mm)
GGOx 30-CEQ	99,6 ± 0,1
GGOx 30-CEQ-VB	99,2 ± 0,2
GGOx 50-CEQ	96,4 ± 0,3
GGOx 50-CEQ-VB	96,2 ± 0,3
GGOx 70-CEQ	93,2 ± 0,1
GGOx 70-CEQ-VB	92,8 ± 0,2

Fonte: dados da pesquisa.

4.4.10 Avaliação do comportamento de autocura (*Self-healing*) dos hidrogéis

A capacidade de autocura dos hidrogéis é uma das propriedades importantes para a engenharia de tecidos, pois essa propriedade pode restaurar as estruturas e funcionalidades dos hidrogéis mesmo após o material sofrer algum tipo de dano físico, podendo assim prolongar sua vida útil quando utilizado (LIU *et al.*, 2023).

Como é mostrado na Figura 44A, o valor de G' para o hidrogel estudado (GGOx 50-CEQ-VB) diminui até que atinja a deformação $\cong 32\%$, sugerindo que nessa faixa o material pode suportar deformações elásticas. No entanto, quando os valores de deformação começam aumentar, é possível observar o ponto de interseção entre o módulo de armazenamento (G') e o módulo de perda (G'') com um valor de 32% de tensão, indicando que o hidrogel está no estado sol-gel e próximo ao seu ponto crítico.

Depois disso, foi conduzido o teste de recuperação do hidrogel usando o teste de deformação cíclica contínua (1% de deformação \rightarrow 60 % de deformação \rightarrow 1% de deformação, a uma frequência angular constante de 1 Hz).

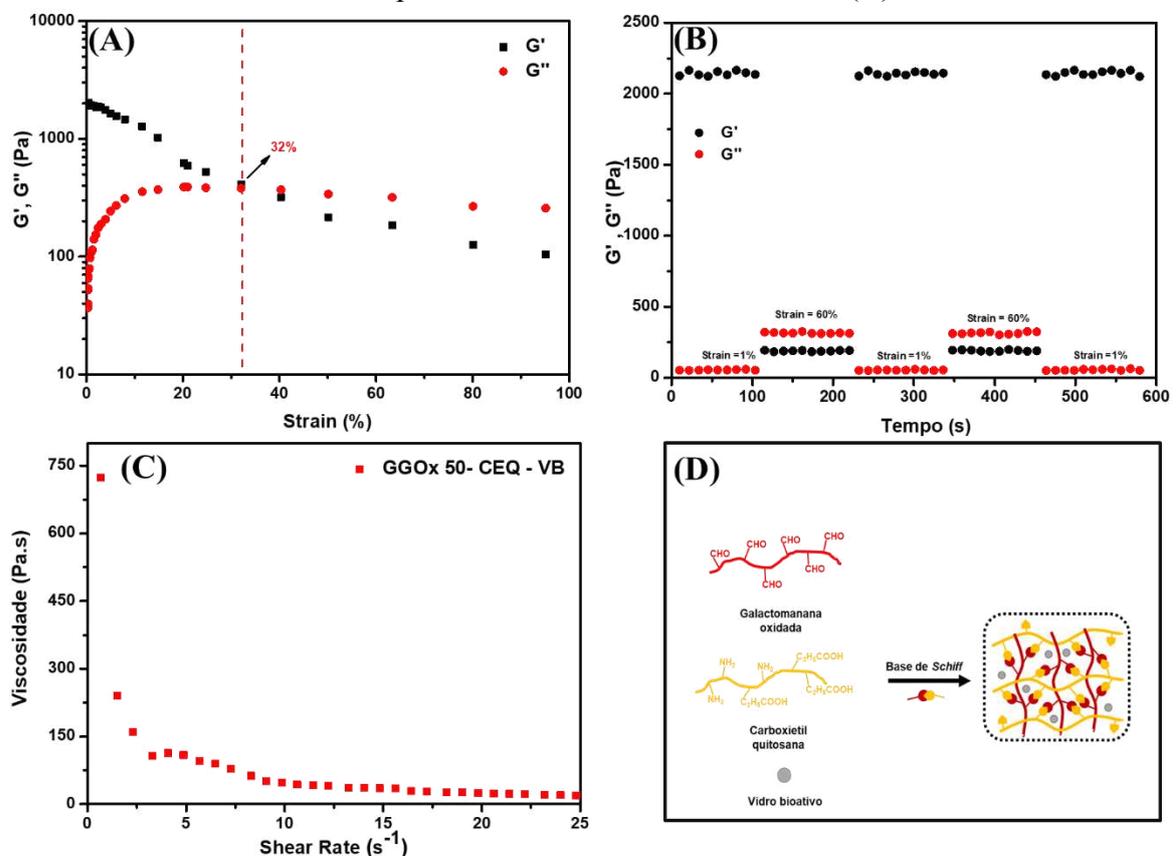
Conforme apresentado na Figura 44B, há uma deformação de $\gamma = 60\%$ (valor esse que ultrapassa o ponto crítico que foi determinado em 32%). O hidrogel foi convertido para um estado sol ($G' < G''$), assim foi possível observar uma mudança nos valores de G' e G'' quando se aplica esse valor de tensão, em que G' diminui de $\cong 2000$ Pa para $\cong 100$ Pa devido ao colapso da rede tridimensional do hidrogel (ZHOU *et al.*, 2021a). Uma vez que a tensão retorna para $\gamma = 1\%$, o hidrogel se forma novamente e os valores de G' e G'' retornam rapidamente ao seu valor inicial com a recuperação da estrutura do hidrogel sem qualquer diminuição nos valores dos módulos. O comportamento rápido de transição sol-gel observado nesses estudos poderia ser totalmente revertido e reproduzido durante os três testes cíclicos estudados nesse trabalho. Além disso, testes de compressão cíclica mostram alta recuperabilidade elástica da rede

polimérica, que é de fundamental importância para a engenharia tecidual (YIN, *et al.*, 2023; DING, *et al.*, 2023).

Na Figura 44C foi realizada uma medição de viscosidade do hidrogel a 37 °C e como esperado, ao aumentar a taxa de cisalhamento (0,1 a 25 Hz), a viscosidade diminuiu. Este comportamento está relacionado à quebra induzida da rede tridimensional formada no hidrogel pelas forças hidrodinâmicas geradas após a aplicação do cisalhamento.

Os resultados sugerem que a rede polimérica do hidrogel exibe uma rápida recuperação e uma boa viscosidade quando ele é submetido a testes oscilatórios.

Figura 44 – Propriedade de autocura dos hidrogéis GGOx 50-CEQ-VB. Valores de G' e G'' para *strain sweep* ($\gamma = 0,1\%-100\%$) (A) com uma frequência angular fixada em (10 rad s^{-1}), G' e G'' mudando de baixa deformação ($\gamma = 1,0\%$) para alta deformação ($\gamma = 60,0\%$) (B) com uma frequência angular fixada em (10 rad s^{-1}) no ciclo de *strain*. Cada intervalo de ciclo foi mantido por 100 s. Viscosidade determinada por reologia oscilatória do hidrogel (C). Imagem da formação dos hidrogéis através da formação da base de *Schiff* com vidro bioativo incorporada em sua rede tridimensional (D)

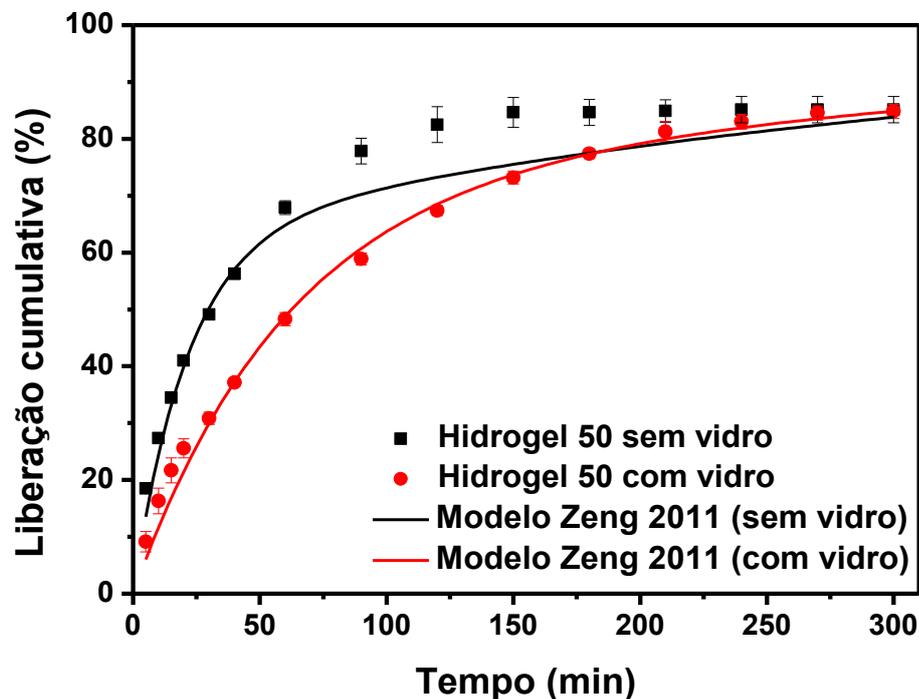


Fonte: dados da pesquisa.

4.4.11 Liberação da tetraciclina incorporada ao hidrogel

O perfil de liberação da tetraciclina incorporada aos hidrogéis foi avaliado em tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹). Os hidrogéis apresentaram uma liberação de explosão inicial da tetraciclina nos primeiros minutos de experimento seguido de uma liberação lenta do fármaco (Figura 45), chegando à liberação máxima de 85% (m/m). A liberação mais rápida da tetraciclina no hidrogel sem o vidro (150 min) em comparação com o hidrogel com o vidro (240 min) pode ser explicado pelo menor tamanho de poros no hidrogel com o vidro em comparação com o hidrogel sem o vidro.

Figura 45 – Liberação cumulativa da tetraciclina incorporada aos hidrogéis com e sem vidro bioativo



Fonte: dados da pesquisa.

A cinética de liberação da tetraciclina pelos hidrogéis foi estudado utilizando o modelo cinético de Zeng, An e Wu (2011). Esse modelo descreve sistemas de liberação nos quais dois mecanismos (difusão rápida e associação/dissociação lenta) são observados em função do tempo. O modelo assume uma exponencial de segunda ordem de acordo com a Equação 13:

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{k_{off}}{k_{on}+k_{off}} (1 - e^{-k_{st}t}) + \frac{k_{on}}{k_{on}+k_{off}} (1 - e^{-k_{off}t}) \quad (13)$$

Em que: k_s corresponde a taxa de difusão, k_{on} a taxa de associação do fármaco e k_{off} a taxa de dissociação do fármaco.

A diferença de energia livre (ΔG) entre os estados do fármaco livre e ligado (Equação 14) pode ser usada para determinar a quantidade de fármaco inicialmente livre e associado a matriz:

$$\Delta G = -K_B T \ln \left(\frac{k_{on}}{k_{off}} \right) \quad (14)$$

Em que: K_B é a constante de *Boltzmann* ($1,38 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta do experimento (310 K).

Neste estudo, portanto, três parâmetros, ΔG (em vez de k_{on}), k_s , k_{off} , são usados para descrever o mecanismo de liberação cumulativa da tetraciclina (Tabela 15).

Tabela 15 - Parâmetros estimados pelo modelo cinético de Zeng para liberação cumulativa da tetraciclina dos hidrogéis

Hidrogel	Parâmetros do modelo de Zeng				
	$k_s \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$k_{on} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$k_{off} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$\Delta G \text{ (J)}$	R^2
Sem o vidro	$4,62 \times 10^{-2}$	$1,60 \times 10^{-3}$	$2,74 \times 10^{-3}$	$2,30 \times 10^{-21}$	0,96
Com o vidro	$1,17 \times 10^{-2}$	$8,77 \times 10^{-4}$	$2,21 \times 10^{-3}$	$3,95 \times 10^{-21}$	0,99

k_s : taxa de difusão do fármaco; k_{on} : taxa de associação do fármaco; k_{off} : taxa de dissociação do fármaco; ΔG : diferença de energia livre entre os estados do fármaco livre e ligado.

Fonte: dados da pesquisa.

Os hidrogéis apresentaram valores $k_s \gg k_{on}$ e $k_s \gg k_{off}$ (Tabela 15), descrevendo uma liberação rápida do fármaco livre via difusão, seguida de uma liberação lenta do fármaco associado ao hidrogel, que é ditada pelo processo de dissociação (ZENG; AN; WU, 2011). O maior valor de k_s para o hidrogel sem o vidro em comparação com o hidrogel com o vidro, confirma a liberação mais rápida da tetraciclina desse sistema ditada pelo mecanismo de difusão (ZENG; AN; WU, 2011).

4.5 Caracterização biológica *in vitro* dos hidrogéis

4.5.1 Análise dos produtos em linhagem de fibroblastos (L929)

Neste trabalho foram realizados ensaios de redução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Todos os hidrogéis estudados foram submetidos aos ensaios *in vitro*.

O ensaio de MTT é empregado para avaliar a viabilidade celular, através da quantificação da redução do MTT presente no meio de cultura pela atividade metabólica das células, resultando na formação de cristais de formazan de coloração azul. Portanto, a quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, está diretamente relacionada com o número de células viáveis (GHASHID *et al.*, 2021). Conforme ilustrado na Figura 46, o ensaio de MTT demonstrou que os hidrogéis produzidos não apresentam toxicidade em relação ao tipo de célula testada (L929).

A viabilidade celular das amostras em contato com células L929 (Figura 46) variou de $100,0 \pm 2,6\%$ (GGOx 70-CEQ-VB) a $117,08 \pm 5,0\%$ (GGOx 30-CEQ-VB). Nenhum dos grupos experimentais demonstrou qualquer efeito tóxico nas células após 72 horas de exposição. Além disso, não foi observada diferença estatisticamente significativa quando os resultados foram comparados com o grupo controle.

Entretanto, quando comparado todos os hidrogéis com VB incorporados em sua estrutura, pode-se notar uma pequena diminuição significativa na viabilidade celular, com valores de 117,08%, 101,87% e 100,00%, respectivamente.

Os valores de viabilidade celular se mantiveram acima de 50%, um limiar acima do qual os materiais são considerados não citotóxicos.

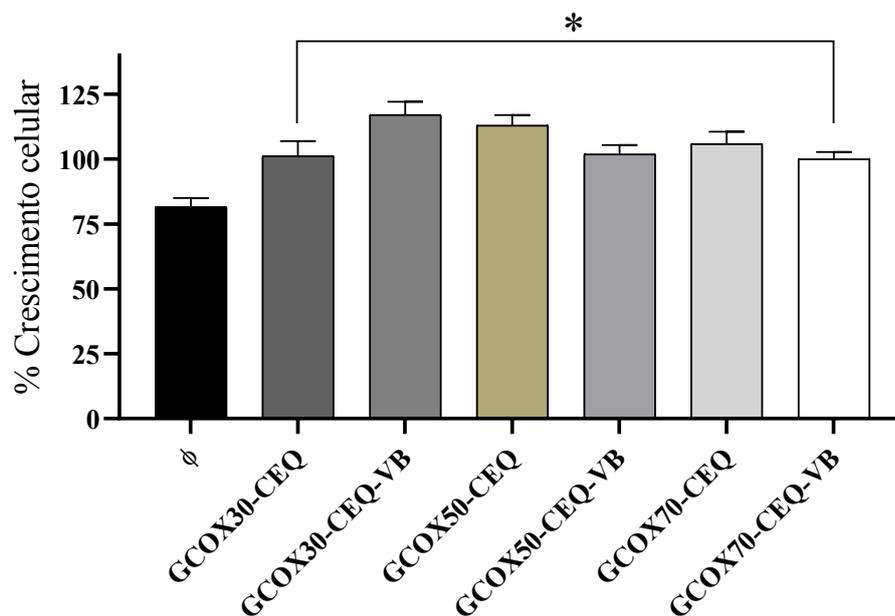
O percentual de viabilidade celular das amostras testadas foi apresentado na Tabela 16 e Figuras 46 e 47.

Tabela 16 – Percentual da viabilidade celular *in vitro* em células não-tumorais após 72 horas de incubação com as amostras, determinado pelo método do MTT. VC – Viabilidade Celular; EPM – Erro Padrão da Média

AMOSTRAS	VC (%)	(EPM)
Controle negativo	81,63	3,36
GGOx 30-CEQ	101,20	5,67
GGOx 30-CEQ-VB	117,08	5,01
GGOx 50-CEQ	112,95	4,04
GGOx 50-CEQ-VB	101,87	3,59
GGOx 70-CEQ	105,84	4,70
GGOx 70-CEQ-VB	100,00	2,67

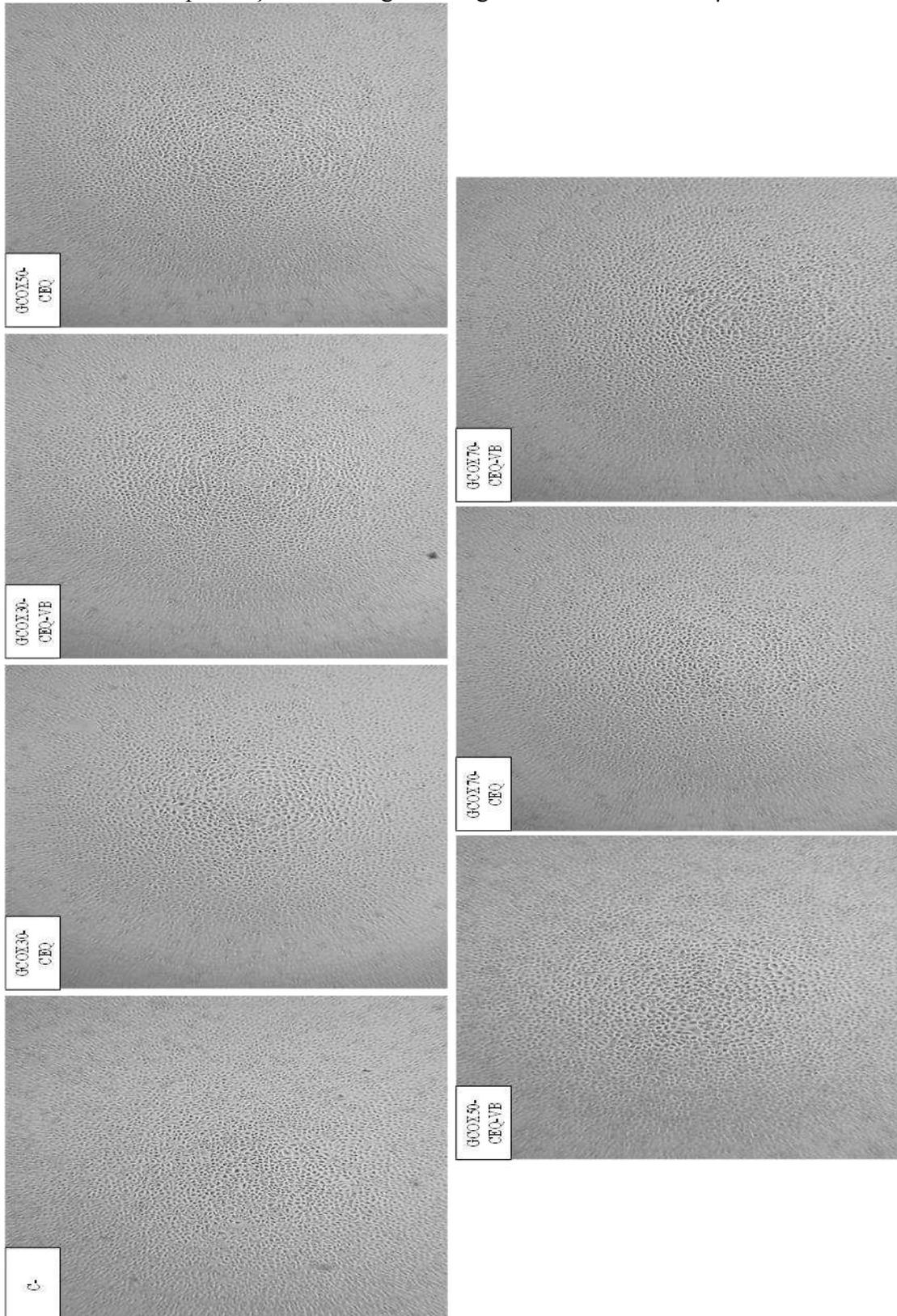
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 46 – Percentual da viabilidade celular em células de fibroblasto murino L929 após 72 horas de incubação com as amostras, determinado pelo método do MTT



Percentual de viabilidade de células L929 após 72 horas de incubação com os hidrogéis. Células do controle negativo (Ø) receberam meio DMEM. Os dados representam médias \pm E.P.M (n = 2). Diferenças estatisticamente significativas estão representadas em asteriscos: $*p < 0,001$, One-way ANOVA, seguida de pós-teste de Dunnett. Fonte: dados da pesquisa.

Figura 47 - Imagens representativas de células L929 após 72 horas de incubação na ausência ou presença dos hidrogéis. Imagens em escala de 100 μm



Fonte: dados da pesquisa.

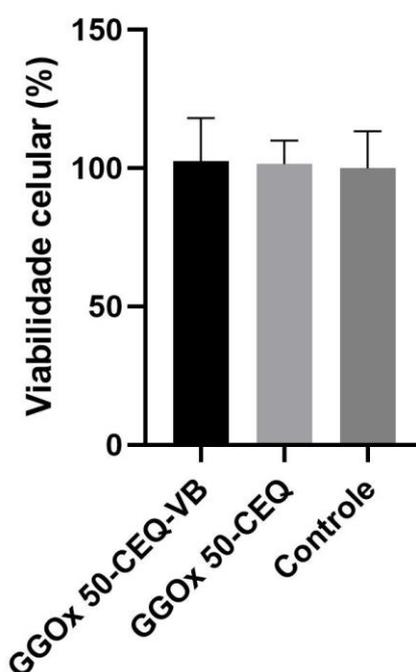
4.5.2 Análise dos produtos em linhagem de osteoblasto

A análise de citotoxicidade *in vitro* foi avaliada em termos da viabilidade celular das células OFCOL II. Neste trabalho foram realizados ensaios de redução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). As amostras GGOx 50-CEQ e GGOx 50-CEQ-VB foram submetidas aos ensaios *in vitro*.

Conforme ilustrado na Figura 48, os resultados do ensaio MTT indicam a não toxicidade dos hidrogéis produzidos em relação ao tipo celular avaliado. Os níveis de viabilidade permaneceram consistentemente acima de 50%, ultrapassando o limiar que define materiais como não citotóxicos.

As amostras em contato com células OFCOL II (Figura 48) demonstraram níveis de viabilidade celular variando de 98% (GGOx50-CEQ) a 104% (GGOX50-CEQ-VB). Após 24 horas de exposição, nenhum dos grupos experimentais exibiu efeito tóxico nas células OFCOL II, verificou-se não existir diferença com significância estatística entre esses materiais e grupo controle ($p = 0,913$), evidenciando que tais materiais não apresentam toxicidade para tal linhagem. Esses resultados preliminares *in vitro* sugerem que a incorporação de VB (substituto ósseo) pode ter favorecido a criação de um microambiente mais propício para a adesão e desenvolvimento da cultura celular testada.

Figura 48 – Avaliação da citotoxicidade dos materiais em linhagem de osteoblasto



Fonte: dados da pesquisa.

5 CONCLUSÃO

O tratamento álcool/ácido despolimerizou a goma guar de forma eficiente. O produto obtido exibe propriedades físico-químicas melhoradas que facilitam a manipulação e a solubilização.

Os derivados oxidados, obtidos a partir da oxidação com íon periodato, foram caracterizados por titulação potenciométrica, FTIR, RMN ^1H e GPC. Por meio dos dados pôde-se confirmar a formação dos grupos aldeídos e das estruturas envolvidas pós processo oxidativo.

A carboxietilação da quitosana, utilizando o ácido acrílico, foi confirmada por FTIR e RMN ^1H . Pôde-se visualizar a introdução de um novo grupo funcional, ausente no polissacarídeo de origem.

As nanopartículas de VB foram caracterizadas por diferentes técnicas confirmando sua forma esférica e tamanho nanométrico.

Os hidrogéis GGOx-CEQ, sintetizados via base de *Schiff*, foram caracterizados por FTIR, GPC e RMN ^1H , em que foi possível observar a dependência da densidade de reticulação com o grau de oxidação da goma guar.

Os suportes porosos GGOx-CEQ-VB foram caracterizados por FTIR, T_{gel} , porosidade em etanol, alta injetabilidade e seringabilidade, boa degradabilidade com um intumescimento estável no tempo estudado. Além disso, os hidrogéis também apresentaram uma liberação controlada de fármaco.

Conclui-se que a utilização de matéria prima biodegradável com baixa toxicidade torna os hidrogéis injetáveis à base de goma guar oxidada e carboxietilquitosana com vidro bioativo incorporado em um potencial compósito para a aplicação na área dos biomateriais, como, por exemplo, regeneração tecidual (tecido ósseo), agentes de liberação de fármaco e preenchimento de espaços, pois é possível modular as propriedades desses hidrogéis pelo grau de oxidação, carboxietilquitosana quanto pela razão mássica de vidro bioativo no material.

REFERÊNCIAS

- ABEER, B. Design of chitosan based acrylic polymer as a carrier for water soluble drug. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 65, p. 657, 2022.
- ALI, A.; HASAN, A.; SINGH, Y. Effect of cellulose nanocrystals on xylan/chitosan/ nano β -TCP composite matrix for bone tissue engineering. **Cellulose**, v. 29, p. 5689, 2022.
- ALINE, A.; OLIVEIRA, R. De; CARVALHO, B. B. De; MANSUR, H. S. Synthesis and characterization of bioactive glass particles using an ultrasound-assisted sol-gel process: Engineering the morphology and size of sonogels via a poly (ethyleneglycol) dispersing agent. **Materials Letters**, v. 133, p. 44, 2014.
- ALVES, H. L. R.; DOS SANTOS, L. A.; BERGMANN, C. P. Injectability evaluation of tricalcium phosphate bone cement. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, p. 2241, 2008.
- 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**, v. 17, p. 2972, 2016.
- ANAYO, O.; ABDU, O.; IBRAHIM, S.; BELLO, A. Synthesis techniques , characterization and mechanical properties of natural derived hydroxyapatite scaffolds for bone implants : a review. **SN Applied Sciences**, v. 822, p. 3, 2021.
- ANNABI, N.; NICHOL, J. W.; PH, D.; ZHONG, X.; JI, C. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. **Tissue Engineering: Parte B**, v. 16, p. 371, 2010.
- ARCOS, D.; PORTOLÉS, M. T. Mesoporous bioactive nanoparticles for bone tissue applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, p. 3249, 2023.
- ARDEAN, C.; DAVIDESCU, C. M.; NEMES, N. S.; NEGREA, A.; CIOPEC, M. DUTEANU, N.; NEGREA, P.; DUDA-SEIMAN, D.; MUSTA, V. Factors influencing the antibacterial activity of chitosan and chitosan modified by functionalization. **International Journal of Molecular Science**, v. 22, p. 7449, 2021.
- BALAKRISHNAN, B.; LESIEUR, S.; LABARRE, D.; JAYAKRISHNAN, A. Periodate oxidation of sodium alginate in water and in ethanol-water mixture : a comparative study. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1425, 2005.
- 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**, v. 53, p. 343, 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**, v. 31, p. 152, 2016.

BARRIONI, B. R.; NARUPHONTJIRAKUL, P.; NORRIS, E.; LI, S.; KELLY, N. L.; HANNA, J. V.; STEVENS, M. M.; JONES, J. R.; PEREIRA, M. D. M. Effects of manganese incorporation on the morphology, structure and cytotoxicity of spherical bioactive glass nanoparticles. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 547, p. 382, 2019.

BARRIONI, B. R.; OLIVEIRA, A. C.; FA, M. De; MAGALHA, M. De. Sol–gel-derived manganese-releasing bioactive glass as a therapeutic approach for bone tissue engineering. **Journal materials Science**, v. 52, p. 8904, 2017.

BLAŽIĆ, R.; MARUŠIĆ, K.; VIDOVIĆ, E. Swelling and viscoelastic properties of cellulose-based hydrogels prepared by free radical polymerization of dimethylaminoethyl methacrylate in cellulose solution. **Gels**, v. 9, p. 94, 2023.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14, 1996.

BURITI, F. C. A.; DOS SANTOS, K. M. O.; SOMBRA, V. G.; MACIEL, J. S.; SÁ, D. M. A. T.; SALLES, H. O.; OLIVEIRA, G.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; MOREIRA, A. C. O. M.; MOREIRA, R. A.; EGITO, A.S. Food hydrocolloids characterisation of partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds as a potential dietary fibre. **Food hydrocolloids**, v. 35, p. 512, 2014.

CAPÁKOVÁ, Z.; FI, M.; KU, I.; VÍCHA, J. Biocompatible dialdehyde cellulose/poly (vinyl alcohol) hydrogels with tunable properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 218, p. 333, 2019.

CASTRO, R. R.; SILVA, C. M. M.; NUNES, R. M.; CUNHA, P. L. R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; GIRÃO, V. C. C.; POMPEU, M. M. L.; LEITE, J. A. D.; ROCHA, F. A. C. Structural characteristics are crucial to the benefits of guar gum in experimental osteoarthritis. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 392, 2016.

CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; SIMÕES, J.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, M. R. M.; COIMBRA, M. A.; VICENTE, A. A. Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 179, 2011.

CHATTRAIRAT, A.; KANDARE, E.; AIMMANEE, S.; TRAN, P.; DAS, R. Development and characterisation of hybrid composite skin simulants based on short polyethylene fibre and bioactive glass particle-reinforced silicone. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 123, p. 105424, 2022.

CHEN, H.; DING, Z.; YAN, D.; HE, H.; XI, W.; HU, J.; ZHANG, R.; YAN, Y.; ZHANG, Q. Double-network composites based on inorganic fillers reinforced dextran-based hydrogel with high strength. **Carbohydrate Polymers**, v. 296, p. 119900, 2022.

CILURZO, F.; SELMIN, F.; MINGHETTI, P.; ADAMI, M.; BERTONI, E.; LAURIA, S.; MONTANARI, L. Injectability evaluation : An open issue. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, p. 604, 2011.

DALEI, G.; DAS, S. Carboxymethyl guar gum : A review of synthesis, properties and versatile applications. **European Polymer Journal** v. 176, p. 111433, 2022.

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

DE FRANCE, K. J. De; CHAN, K. J. W.; CRANSTON, E. D.; HOARE, T. Enhanced mechanical properties in cellulose nanocrystal–Poly(oligoethylene glycol methacrylate) injectable nanocomposite hydrogels through control of physical and chemical cross-linking. **Biomacromolecules**, v. 17, p. 649, 2016.

DEA, B. Y. I. C. M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 31, p. 241, 1975.

DING, F.; SHI, X.; LI, X.; CAI, J.; DUAN, B.; DU, Y. Homogeneous synthesis and characterization of quaternized chitin in NaOH/urea aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 422, 2012.

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**, v. 26, p. 1571, 2015.

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**, v. 14, p. 347, 2015.

DUAN, H.; CAO, C.; WANG, X.; TAO, J.; LI, C.; XIN, H.; YANG, J.; SONG, Y.; AI, F. Magnesium-alloy rods reinforced bioglass bone cement composite scaffolds with cortical bone-matching mechanical properties and excellent osteoconductivity for load-bearing bone in vivo regeneration. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1, 2020.

EBISAWA, K.; OHURA, Y. Bioactivity of CaO • SiO₂-based glasses: In vitro evaluation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 1, p. 239, 1990.

EL-FIQI, A.; MANDAKHBAYAR, N.; BIN, S.; KNOWLES, J. C.; LEE, J.; KIM, H. Capacity of mesoporous bioactive glass nanoparticles to deliver therapeutic molecules. **Nanoscale**, v. 4, p. 7475, 2012.

EL-KADY, A. M.; ALI, A. F. Fabrication and characterization of ZnO modified bioactive glass nanoparticles. **Ceramics International**, v. 38, p. 1195, 2012.

FARANO, V.; MAURIN, J.; ATTIK, N.; JACKSON, P.; GROSGOGEAT, B.; GRITSCH, K. Review article Sol–gel bioglasses in dental and periodontal regeneration : A systematic review. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 107, p. 1210, 2018.

- 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**, v. 35, p. 5425, 2014.
- FERREIRA, C. R. do N.; EVERTON, E. L.; ARAUJO, L. F. S.; LEONIRA, L. M.; FEITOSA, J. P. A.; CUNHA, A. F.; OLIVEIRA, M. B.; MANO, J. F.; DA S. MACIEL, J. Synthesis and characterization of scaffolds produced under mild conditions based on oxidized cashew gums and carboxyethyl chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 176, p. 26, 2021.
- GATTO, C.; RUZZA, P.; GIURGOLA, L.; HONISCH, C.; ROSSI, O.; ROMANO, M. R.; RAGAZZI, E.; TÓTHOVA, J. D. Comparison of perfluorocarbon liquids cytotoxicity tests: Direct contact versus the test on liquid extracts. **ACS Omega**, v. 8, p. 365, 2023.
- GAO, L.; ZHOU, Y.; PENG, J.; XU, C.; XU, Q.; XING, M.; CHANG, J. A novel dual-adhesive and bioactive hydrogel activated by bioglass for wound healing. **NPG Asia Materials**, v. 11, p. 66, 2019.
- GAO, J.; SONG, M.; LI, T.; ZHAO, Y.; WANG, A. Water-soluble carboxymethyl chitosan (WSCC)-modified single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) provide efficient adsorption of Pb(II) from water. **RSC Advances**, v. 12, p. 6821, 2022.
- GEORGE, A.; SHAH, P. A.; SHRIVASTAV, P. S. Guar gum: Versatile natural polymer for drug delivery applications. **European Polymer Journal**, v. 112, p. 722, 2019.
- GHASEMI, M.; TURNBULL, T.; SEBASTIAN, S.; KEMPSON, I.; The MTT Assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 12827, 2021.
- GOMES, R. F.; LIMA, L. R. M.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B.; PAULA, R. C. M. De. Influence of galactomannan molar mass on particle size galactomannan-grafted-poly-N-isopropylacrylamide copolymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 156, p. 446, 2020.
- GOMEZ, C. G.; RINAUDO, M.; VILLAR, M. A. Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 296, 2007.
- GUAN, X.; AVCI-ADALI, M.; ALARÇIN, E.; CHENG, H.; KASHAF, S. S.; LI, Y.; CHAWLA, A.; JANG, H. L.; KHADEMHOSEINI, A. Development of hydrogels for regenerative engineering. **Biotechnology Journal**, v. 12, p. 1, 2017.
- GUNAWIDJAJA, P. N.; MATHEW, R.; LO, A. Y.; BARBA, I. I.; GARCIA, A.; ARCOS, D.; VALLET-REGI, M.; ÉDEN, M. Local structures of mesoporous bioactive glasses and their surface alterations in vitro : inferences from solid-state nuclear magnetic resonance. **Philosophical transactions of the royal society**, v. 370, p. 1376, 2012.
- GUO, J.; YAO, H.; LI, X.; CHANG, L.; WANG, Z.; ZHU, W.; SU, Y.; QIN, L.; XU, J. Advanced hydrogel system for mandibular reconstruction. **Bioactive Materials**, v. 21, p. 175, 2023.

GUO, Y.; WANG, X. Oxidized sodium alginate crosslinked silk fibroin composite scaffold for skin tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 15, p. 1, 2022.

H. CHAO, J. HAIGENG, Q. YIHUI, W. QIAN, L. XIAOLING, Z. WEIFENG, Z. C. Heparin-based and heparin-inspired hydrogels: size-effect, gelation and biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, p. 1186, 2019.

HARTMANN, N. B.; HUFFER, T.; THOMPSON, R. C.; HASSELLLOV, M.; VERSCHOOR, A.; DAUGAARD, A. E.; RIST, S.; KARLSSON, T.; BRENNHOLT, N.; COLE, M.; HERRLIN, M. P.; HESS, M. C.; IVLEVA, N. P.; LUSHER, A. L.; WAGNER, M. Are we speaking the same language? Recommendations for a definition and categorization framework for plastic debris. **Environmental science e technology**, v. 53, p. 1039, 2019.

HASAN, L.; KIM, B.; PADALHIN, A. R.; FARUQ, O.; SULTANA, T. In vitro and in vivo evaluation of bioglass microspheres incorporated brushite cement for bone regeneration. **Materials Science & Engineering C**, v. 103, p. 109775, 2019.

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**, v. 8, p. 11416, 2018.

HENCH, L. P. H. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 42, p. 25, 1973.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 265, 2013.

HOO, C. M.; STAROSTIN, N.; WEST, P.; MECARTNEY, M. L. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, p. 89, 2008.

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**, v. 19, p. 288, 2018.

HU, Q.; LI, Y.; ZHAO, N.; NING, C.; CHEN, X. Facile synthesis of hollow mesoporous bioactive glass sub-micron spheres with a tunable cavity size. **Materials Letters**, v. 134, p. 130, 2014.

HU, W.; WANG, Z.; XIAO, Y. Biomaterials science advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. **Biomaterials Science**, v. 7, p. 843, 2019.

HUANG, J.; XIE, H.; YE, H.; XIE, T.; GONG, J.; JIANG, C.; LIN, Y.; WU, Y.; LIU, S.; CUI, Y.; MAO, J.; MEI, L. Preparation, characterization, and biochemical activities of N -(2-Carboxyethyl)chitosan from squid pens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 2464, 2015.

HUANG, J.; XIE, H.; HU, S.; XIE, T.; GONG, J.; JIANG, C.; GE, Q.; 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**, v. 138, p. 301, 2016.

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

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5 (2009). **Biological evaluation of medical devices – part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**.

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

INMACULADA, A.; ANDRÉS, R. A.; MARIA, C. C.; CONCEPCION, A.; BEGONA, E.; ANGELES, H. C.; NIURIS, A. Chitosan: An overview of its properties and applications. **Polymers**, v. 13, p. 3256, 2021.

IRAJI, M.; SALEHI, M.; ESHAGHI, R.; KHALEGHIAN, A.; SHAMSI, F. Liposomal formulation of new arsenic Schiff base complex as drug delivery agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia and quantum chemical and docking calculations. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 75, p. 103600, 2022.

JAFARI, N.; HABASHI, M. S.; HASHEMI, A.; SHIRAZI, R.; TANIDEH, N.; TAMADON, A. Application of bioactive glasses in various dental fields. **Biomaterials Research**, v. 26, p. 1, 2022.

JHA, R.; MAYANOVIC, R. A. A review of the preparation, characterization, and applications of chitosan nanoparticles in nanomedicine. **Nanomaterials**, v. 13, p. 1302, 2023.

JIA, Y.; LI, J. Molecular assembly of Schiff base interactions: Construction and application. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 1597, 2015.

JONES, J. R.; TSIGKOU, O.; COATES, E. E.; STEVENS, M. M.; POLAK, J. M.; HENCH, L. L. Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells. **Biomaterials**, v. 28, p. 1653, 2007.

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**, v. 463, p. 112, 2017.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, p. 5474, 2005.

KASTRIN, M.; ROVAN, V. U.; FRANGEŽ, I. Possible advantages of S53P4 bioactive glass in the treatment of septic osteoarthritis of the first metatarsophalangeal joint in the diabetic foot. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, p. 1, 2021.

KAZACHENKO, A. S.; AKMAN, F.; SAGAAMA, A.; ISSAOUI, N.; MALYAR, Y. N.; VASILIEVA, N. Y.; BOROVKOVA, V. S. Theoretical and experimental study of guar gum sulfation. **Journal of molecular modeling**, v. 27, p. 1, 2021.

KHUNMANEE, S.; JEONG, Y.; PARK, H. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. **Journal of Tissue Engineering**, v. 8, p. 204173141772646, 2017.

KIM, S.; JEONG, D.; LEE, H.; KIM, D.; JUNG, S. Succinoglycan dialdehyde-reinforced gelatin hydrogels with toughness and thermal stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 281, 2020.

LABBAF, S.; TSIGKOU, O.; MÜLLER, K. H.; STEVENS, M. M.; PORTER, A. E.; JONES, J. R. Biomaterials spherical bioactive glass particles and their interaction with human mesenchymal stem cells in vitro. **Biomaterials**, v. 32, p. 1010, 2011.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. - ARTICLES Tissue Engineering. **Science**, v. 260, p. 920, 1993.

LEE, K. Y.; BOUHADIR, K. H.; MOONEY, D. J. Degradation behavior of covalently cross-linked poly(aldehyde guluronate) hydrogels. **Macromolecules**, v. 33, p. 97, 2000.

LI, D.; YANG, N.; ZHANG, Y.; GUO, L.; SANG, S.; JIN, Z.; XU, X. Structural and physicochemical changes in guar gum by alcohol–acid treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 2, 2018.

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**, v. 5, p. 92490, 2015.

LI, S.; MAO, W.; XIA, L.; WU, X.; GUO, Y.; WANG, J.; HUANG, J.; XIANG, H.; JIN, L.; FU, H.; SHOU, Q. An injectable, self-healing and degradable hydrogel scaffold as a functional biocompatible material for tissue engineering applications. **Journal of Materials Science**, v. 58, p. 6710, 2023.

LI, X.; SUN, Q.; LI, Q.; KAWAZOE, N.; CHEN, G. Functional hydrogels with tunable structures and properties for tissue engineering applications. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 1, 2018.

LI, Y.; CHEN, X.; NING, C.; YUAN, B.; HU, Q. Facile synthesis of mesoporous bioactive glasses with controlled shapes. **Materials Letters**, v. 161, p. 605, 2015.

LI, Y.; RODRIGUES, J.; TOMÁS, H. Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 2193, 2012.

LI, Y.; ZHANG, Y.; SHI, F.; TAO, L.; WEI, Y.; WANG, X. Modulus-regulated 3D-cell proliferation in an injectable self-healing hydrogel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 149, p. 168, 2017.

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**, v. 5, p. 94248, 2015.

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

LIMA, E. L.; VASCONCELOS, N. F.; MACIEL, J. da S.; ANDRADE, F. J.; VIEIRA, R. S.; FEITOSA, J. P. A. Injectable hydrogel based on dialdehyde galactomannan and N-succinyl chitosan : a suitable platform for cell culture. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 31, p. 1, 2020.

LIN, Q.; ZHANG, X.; WANG, W.; LI, S.; LI, J.; HAO, L. The structural evolution of Bioglass after implantation in the femoral defects. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 552, p. 120439, 2021.

LIU, D.; LI, L.; SHI, B. L.; SHI, B.; LI, M. D.; QIU, Y.; ZHAO, D.; SHEN, Q. D.; ZHU, Z. Z. Ultrasound-triggered piezocatalytic composite hydrogels for promoting bacterial-infected wound healing. **Bioactive Materials**, v. 24, p. 96, 2023.

LIU, H.; LI, C.; WANG, B.; SUI, X.; WANG, L. Self-healing and injectable polysaccharide hydrogels with tunable mechanical properties. **Cellulose**, v. 25, p. 559, 2018.

LIU, J.; WANG, K.; LUAN, J.; WEN, Z.; WANG, L.; LIU, Z.; WU, G.; ZHUO, R. Visualization of in situ hydrogels by MRI in vivo. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, p. 1343, 2016.

LOU, C.; TIAN, X.; DENG, H.; WANG, Y.; JIANG, X. Dialdehyde- β -cyclodextrin-crosslinked carboxymethyl chitosan hydrogel for drug release. **Carbohydrate Polymers**, v. 231, p. 115678, 2020.

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**, v. 7, p. 13029, 2015.

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**, v. 304, p. 1, 2019.

MALIK, U. S.; BILAL, M.; NIAZI, K.; JAHAN, Z.; IQBAL, M.; DAI, Z.; VO, V. N. Nano-structured dynamic Schiff base cues as robust self - healing polymers for biomedical and tissue engineering applications: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 20, p. 495, 2022.

MANDRYCKY, C.; PHONG, K.; ZHENG, Y. Tissue engineering toward organ-specific regeneration and disease modeling. **MRS Communication**, v. 7, p. 332, 2017.

MANIMARAN, D.; ELANGO VAN, N.; MANI, P.; SUBRAMANIAN, K.; ALI, D.; ALARIFI, S.; PALANISAMY, C. P.; ZHANG, H.; RANGASAMY, K.; PALANISAMY, V.; MANI, R.; GOVARTHANAN, K.; ARUNI, W.; SHANMUGAM, R.; SRINIVASAN, G. P.; KALIRAJAN, A. Isolongifolene-loaded chitosan nanoparticles synthesis and characterization for cancer treatment. **Scientific Reports**, v. 12, p. 1, 2022.

MARTIN, A. A.; SASSAKI, L. G.; SIERAKOWSKI, M. R. Effect of adding galactomannans on some physical and chemical properties of hyaluronic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 527, 2020.

MEHROTRA, D.; DWIVEDI, R.; NANDANA, D.; SINGH, R. K. From injectable to 3D printed hydrogels in maxillofacial tissue engineering: A review. **Journal of oral biology and craniofacial research**, v. 4, p. 680, 2020.

MICHAEL, Z.; ANNALISA, C.; NADIA, G.; MARTA, C.; FRANCESCA, F.; MINNA, H.; CANDIDO, F. P.; MARCO, S. Microwave-assisted methacrylation of chitosan for 3D printable hydrogels in tissue engineering. **Materials Advances**, v. 3, p. 514, 2022.

MISHRA, D.; SINGH, A.; CHANDA, D.; SHANKER, K.; KHARE, P. Potential of di-aldehyde cellulose for sustained release of oxytetracycline : A pharmacokinetic study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 97, 2019.

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 & Engineering C**, v. 58, p. 1207, 2016.

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**, v. 58, p. 1207, 2016.

MOSQUEIRA, L.; BARRIORI, B. R.; MARTINS, T.; MELO, F. G.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R.; PEREIRA, M. M. Strontium-releasing sol-gel bioactive glass spheres and their ability to stimulate osteogenic differentiation in osteoporotic bone marrow mesenchymal stem cells. **Journal Materials research**, v. 35, p. 459, 2021.

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**, v. 52, p. 333, 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**, v. 26, p. 1918, 2009.

OH, G.; KIM, S.; KIM, T.; JUNG, W. Characterization of an oxidized alginate-gelatin hydrogel incorporating a COS-salicylic acid conjugate for wound healing. **Carbohydrate Polymers**, v. 252, p. 1, 2021.

OWENS, G. J.; SINGH, R. K.; FOROUTAN, F.; ALQAYSI, M.; HAN, C.; MAHAPATRA, C.; KIM, H. Sol-gel based materials for biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v. 77, p. 1, 2016.

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**, v. 8, p. 1, 2018.

PIRAYESH, H.; NYCHKA, J. A. Synthesis of bioactive glass-ceramic 45S5 and its in vitro dissolution and mineralization behavior. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 96, p. 1643, 2013.

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**, v. 340, p. 103, 2018.

PRADHAN, S.; MOORE, K. M.; AINSLIE, K. M.; YADAVALLI, V. K. Flexible, microstructured surfaces using chitin-derived biopolymers. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, p. 5328, 2019.

PRAJAPATI, V. D.; JANI, G. K.; MORADIYA, N. G.; RANDEIRA, N. P.; NAGAR, B. J.; NAIKWADI, N. N.; VARIYA, B. C. Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 83, 2013.

PRIVAR, Y.; SHASHURA, D.; PESTOV, A.; ZIATDINOV, A.; AZAROVA, Y.; BRATSKAYA, S. Effect of regioselectivity of chitosan carboxyalkylation and type of cross-linking on the metal-chelate sorption properties toward ciprofloxacin. **Reactive and Functional Polymers**, v. 150, p. 1, 2020.

PULICKAL, A.; UTHAMAN, S.; CHO, K.; CHO, C.; PARK, I. Injectable hydrogels for delivering biotherapeutic molecules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 17, 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**, v. 58, p. 168, 2017.

RADHAKRISHNAN, J., SUBRAMANIAN, A., KRISHNAN, U. M., & SETHURAMAN, S. Injectable and 3D bioprinted polysaccharide hydrogels : From cartilage to osteochondral tissue engineering. **Biomacromolecules**, v. 18, p. 1, 2016.

REAKASAME, S.; BOCCACCINI, A. R. Oxidized alginate-based hydrogels for tissue engineering applications: A review. **Biomacromolecules**, v. 19, p. 3, 2018.

REAKASAME, S.; JIN, A.; ZHENG, K.; QU, M.; BOCCACCINI, A. R. Biofabrication and characterization of alginate dialdehyde-gelatin microcapsules incorporating bioactive glass for cell delivery application. **Macromolecular Bioscience**, v. 20, p. 1, 2020.

RICCARDO, FONTANA.; PEGGY, CARLA RAFFAELLA, MARCONI.; ANTONELLA, CAPUTO.; VASAK, B. G. Novel chitosan-based Schiff base compounds: Chemical characterization and antimicrobial activity Riccardo. **Molecules**, v. 27, p. 2740, 2022.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 31, p. 603, 2006.

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**, v. 16, p. 31, 1993.

S. PRADHAN, K. MOORE, K. M. AINSLIE, V. K. Yadavalli. Flexible, microstructured surfaces using chitin-derived biopolymers. **Journal materials chemistry B**, v. 7, p. 5328, 2019.

SAHA, A.; TYAGI, S.; GUPTA, R. K.; TYAGI, Y. K. Natural gums of plant origin as edible coatings for food industry applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, p. 959, 2017.

SANTOS, B. M.; SANTOS, H. C.; CARVALHO, W. P.; GARCIA-ROJAS, E. E. Physicochemical , thermal and rheological properties of synthesized carboxymethyl tara gum (*Caesalpinia spinosa*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 595, 2019.

SAPORITO, F.; BAUGH, L. M.; ROSSI, S.; BONFERONI, M. C.; PEROTTI, C.; BLACK, L.; FERRARI, F. In situ gelling scaffolds loaded with platelet growth factors to improve cardiomyocyte survival after ischemia. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 5, p. 329, 2019.

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**, v. 43, p. 272, 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**, v. 2, p. 2240, 2016.

SARKER, B.; PAPAGEORGIOU, D. G.; SILVA, R.; ZEHNDER, T.; GUL-E-NOOR, F.; BERTMER, M.; KASCHTA, J.; CHRISAFIS, K.; DETSCH, R.; BOCCACCINI, A. R. Fabrication of alginate – gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. **Journal materials chemistry B**, v. 2, p. 1470, 2014.

SASHIWA, H.; YAMAMORI, N.; ICHINOSE, Y.; SUNAMOTO, J.; AIBA, S. Chemical modification of chitosan, 17: Michael reaction of chitosan with acrylic acid in water. **Macromolecular Bioscience**, v. 3, p. 231, 2003.

ŠEDOVIÁ, P.; BUFFA, R.; KETTOU, S.; HUERTA-ANGELES, G.; HERMANNOVÁ, M.; LEIEROVÁ, V.; ŠMEJKALOVÁ, D.; MORAVCOVÁ, M.; VELEBNY, V. Preparation of hyaluronan polyaldehyde — a precursor of biopolymer conjugates. **Carbohydrate Polymers**, v. 371, p. 8, 2013.

SELVAKUMAR, G.; LONCHIN, S. Biomaterials advances bioactive functional collagen-oxidized pullulan scaffold loaded with polydatin for treating chronic wounds. **Biomaterials Advances**, v. 140, p. 213078, 2022.

SEPULVEDA, P.; JONES, J. R.; HENCH, L. L. Characterization of Melt-Derived 45S5 and sol-gel – derived 58S Bioactive Glasses. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 58, p. 734, 2001.

SHARMA, G.; SHARMA, S.; KUMAR, A.; AL-MUHTASEB, A. H.; NAUSHAD, M.; GHFAR, A. A.; MOLA, G. T.; STADLER, F. J. Guar gum and its composites as potential materials for diverse applications: A Review. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, p. 534, 2018.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. **Polímeros**, v. 11, p. 58, 2001.

SILVA, C. R.; BABO, P. S.; GULINO, M.; COSTA, L.; OLIVEIRA, J. M.; SILVA-CORREIA, J.; DOMINGUES, R. M. A.; REIS, R. L.; GOMES, M. E. Injectable and tunable hyaluronic acid hydrogels releasing chemotactic and angiogenic growth factors for endodontic regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 77, p. 155, 2018.

SILVA, L. M.; ARAÚJO, L. F. S.; ALVEZ, R. C.; ONO, L.; SÁ, D. A. T.; CUNHA, PABLYANA, L. R.; PAULA, R. C. M.; MACIEL, J. S. Promising alternative gum : Extraction, characterization, and oxidation of the galactomannan of Cassia fistula. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 436, 2020.

SINGH, S.; SINGH, G.; ARYA, S. K. Mannans: An overview of properties and application in food products. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 79, 2018.

SIVASHANMUGAM, A.; KUMAR, R. A.; PRIYA, M. V.; NAIR, S. V.; JAYAKUMAR, R. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 72, p. 543, 2015.

STEFFENS, D.; BRAGHIROLI, D. I.; MAURMANN, N.; PRANKE, P. Update on the main use of biomaterials and techniques associated with tissue engineering. **Drug Discovery Today**, v. 23, p. 1474, 2018.

STOYANOV, S. D. Chitin nanowhiskers with improved properties obtained using natural deep eutectic solvent and mild mechanical processing. **Green Chemistry**, v. 24, p. 3834, 2022.

SU, H.; ZHENG, R.; JIANG, L.; ZENG, N.; YU, K.; ZHI, Y.; SHAN, S. Dextran hydrogels via disulfide-containing Schiff base formation : Synthesis, stimuli-sensitive degradation and release behaviors. **Carbohydrate Polymers**, v. 265, p. 1, 2021.

THOMBARE, N.; JHA, U.; MISHRA, S.; SIDDIQUI, M. Z. Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 361, 2016.

THOMMES, M.; KANEKO, K.; NEIMARK, A. V.; OLIVIER, J. P.; RODRIGUEZ-REINOSO, F.; ROUQUEROL, J.; SING, K. S. W. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 87, p. 1051, 2015.

TSIGKOU, O.; LABBAF, S.; STEVENS, M. M.; PORTER, A. E.; JONES, J. R. Monodispersed bioactive glass submicron particles and their effect on bone marrow and adipose tissue-derived stem cells. **Advanced healthcare materials**, v. 3, p. 115, 2014.

TYAGI, R.; SHARMA, P.; NAUTIYAL, R.; LAKHERA, A. K.; KUMAR, V. Synthesis of quaternised guar gum using Taguchi L (16) orthogonal array. **Carbohydrate Polymers**, v. 237, p. 116136, 2020.

VACANTI, C. A. The history of tissue engineering. **Tissue Engineering Review Series**, v. 10, p. 569, 2006.

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**, v. 54, p. 5, 2013.

VINÍCIUS, M.; MOTTA, L.; VINÍCIUS, E.; CASTRO, R. De; JOSÉ, E.; MURI, B.; VENTURINI, B.; LUIZ, M.; ROBERTO, P. Thermal and spectroscopic analyses of guar gum degradation submitted to turbulent flow. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 43, 2019.

VUKAJLOVIC, D.; PARKER, J.; BRETCANU, O.; NOVAKOVIC, K. Chitosan based polymer/bioglass composites for tissue engineering applications. **Materials Science & Engineering C**, v. 96, p. 955, 2019.

WANG, Q.; CHEN, S.; CHEN, D. Preparation and characterization of chitosan based injectable hydrogels enhanced by chitin nano-whiskers. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 65, p. 466, 2017.

WANG, Y.; PAN, H.; CHEN, X. The preparation of hollow mesoporous bioglass nanoparticles with excellent drug delivery capacity for bone tissue regeneration. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 1, 2019.

WITTE, T. De; FRATILA-APACHITEI, L. E.; ZADPOOR, A. A.; PEPPAS, N. A. Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices. **Regenerative Biomaterials**. v. 5, p. 197, 2018.

X. JUNPENG, L. YI, H. S. Hydrogels based on Schiff base linkages for biomedical applications. **Molecules**, v. 24, p. 3005, 2019.

XIN, Y.; YUAN, J. Schiff's base as a stimuli-responsive linker in polymer chemistry. **Polymer Chemistry**, v. 3, p. 3045, 2012.

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

XU, W.; LIU, Y.; ZHANG, F.; LEI, F.; WANG, K.; JIANG, J. Physicochemical characterization of gleditsia triacanthos galactomannan during deposition and maturation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 821, 2020.

XU, Z.; YUAN, L.; LIU, Q.; LI, D.; MU, C.; ZHAO, L.; LI, X.; GE, L. Crosslinking effect of dialdehyde cholesterol modified starch nanoparticles on collagen hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 285, p. 119237, 2022.

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**, v. 82, p. 1018, 2016.

YIN, Z.; WANG, Y.; WANG, K.; ZHANG, C. The adsorption behavior of hydroxypropyl guar gum onto quartz sand. **Journal of Molecular Liquids**, v. 258, p. 10, 2018.

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**, v. 8, p. 2401, 2012.

YU, X.; CHENG, C.; PENG, X.; ZHANG, K.; YU, X. A self-healing and injectable oxidized quaternized guar gum/carboxymethyl chitosan hydrogel with efficient hemostatic and antibacterial properties for wound dressing. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 209, p. 112207, 2022.

ZENG, J.; HE, Y.; LI, S.; WANG, Y. Chitin whiskers : An overview. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 13, p. 1, 2012.

ZENG, L.; AN, L.; WU, X. Modeling drug-carrier interaction in the drug release from nanocarriers. **Journal of Drug Delivery**, v. 2011, p. 1, 2011.

ZHANG, Z.; WANG, H.; CHEN, T.; ZHANG, H.; LIANG, J.; KONG, W.; YAO, J.; ZHANG, J.; WANG, J. Synthesis and structure characterization of sulfated galactomannan from fenugreek gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 1184, 2019.

ZHAO, H.; HEINDEL, N. D. Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method. **Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 400, 1991.

ZHOU, L.; DAI, C.; FAN, L.; JIANG, Y. Injectable Self-Healing Natural Biopolymer-Based Hydrogel Adhesive with Thermoresponsive Reversible Adhesion for Minimally Invasive Surgery. **Advanced Functional Materials**, v. 31, p. 202007457, 2021.

ZHOU, L.; FAN, L.; ZHANG, F.; JIANG, Y.; CAI, M.; DAI, C.; LUO, Y.; TU, L.; ZHOU, Z.; LI, X.; NING, C.; ZHENG, K.; BOCCACCINI, A. R.; TAN, G. Hybrid gelatin/oxidized chondroitin sulfate hydrogels incorporating bioactive glass nanoparticles with enhanced mechanical properties, mineralization, and osteogenic differentiation. **Bioactive Materials**, v. 6, p. 890, 2021.