



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

LUIS FELIPE SANTOS ARAUJO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL COMO BIOMATERIAL DE HIDROGÉIS DE N-CARBOXIETIL QUITOSANA E GOMA ALFARROBA OXIDADA

FORTALEZA
2022

LUIS FELIPE SANTOS ARAUJO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL COMO BIOMATERIAL DE HIDROGÉIS DE N-CARBOXIETIL QUITOSANA E GOMA ALFARROBA OXIDADA

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Jeanny da Silva Maciel
Coorientadora: Prof^a. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula.

FORTALEZA

2022

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)

A69a Araujo, Luis Felipe Santos.

Avaliação do potencial como biomaterial de hidrogéis de n-carboxietil quitosana e goma alfarroba oxidada / Luis Felipe Santos Araujo. – 2022.
53 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profª. Dra. Jeanny da Silva Maciel.

Coorientação: Profª. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula.

1. Hidrogel. 2. Goma alfarroba. 3. Quitosana. I. Título.

CDD 540

LUIS FELIPE SANTOS ARAUJO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL COMO BIOMATERIAL DE HIDROGÉIS DE N-CARBOXIETIL QUITOSANA E GOMA ALFARROBA OXIDADA

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

Aprovada em: 18/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Adriano Lincoln Albuquerque Mattos
EMBRAPA CE

Prof^a. Dra. Pablyana L. Rodrigues da Cunha
Universidade Federal do Ceará

Prof^a. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula (coorientadora)
Universidade Federal do Ceará

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

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Consuelita e Luiz José, pelo amor, apoio e por sempre priorizarem minha educação.

À toda minha família, pelo suporte e união.

À Prof^a. Dra. Jeanny da Silva Maciel, pela orientação, compreensão e conselhos, especialmente durante esses anos de pandemia.

Às professoras do Laboratório de Polímeros, Pablyana da Cunha, Judith Feitosa e principalmente à Regina Célia pela coorientação.

Ao Carlos Rhamon, por toda a ajuda e conversas durante toda a realização deste trabalho.

Ao Neto pelo auxílio nos ensaios de reologia.

À Nádia pelas análises de FTIR e TGA.

A todos os membros do Laboratório de Polímeros, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFC.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, deixo aqui meu muito obrigado.

RESUMO

Os hidrogéis injetáveis são uma categoria de géis em que os precursores são aplicados diretamente no local desejado, onde ocorre a reticulação, e tem o objetivo de restaurar o tecido lesionado. Polímeros naturais são indicados para sua síntese por apresentarem estruturas que se assemelham à matriz extracelular. A quitosana é um polissacarídeo semissintético insolúvel em água, no entanto a sua solubilidade pode ser aumentada com modificações estruturais, como, por exemplo, a inserção do grupo carboxietil na sua cadeia por meio da reação de adição de Michael com ácido acrílico. A goma alfarroba é uma galactomanana proveniente do endosperma das sementes da *Ceratonia siliqua* que possui dióis vicinais que podem ser oxidados via reação com periodato de sódio. Essa reação produz um polialdeído que pode se ligar aos grupos amina da quitosana por meio da reação de base de Schiff, resultando na reticulação e formação do hidrogel. Este trabalho propõe a preparação de hidrogéis injetáveis formados por N-carboxietil quitosana (NCEQ) e goma alfarroba oxidada (GAO). A goma alfarroba foi oxidada em três diferentes graus de oxidação teóricos (10, 30 e 50%), que foram caracterizados por FTIR, GPC e RMN ^1H . Uma banda em 1728 cm^{-1} ($\nu\text{ C=O}$) no espectro de FTIR confirmou a formação dos grupos aldeído nos derivados oxidados. A reação de oxidação resultou em uma redução da massa molar de pico de 86,3, 97,7 e 99,1% para as gomas oxidadas 10, 30 e 50% respectivamente. Isto indica que a reação é acompanhada de uma degradação na cadeia do polímero. Foram observados novos picos entre 5,7 e 4,1 ppm no espectro de RMN, que são atribuídos a formação de estruturas hemiacetais. A reação de formação de NCEQ foi confirmada pelo aumento da intensidade relativa da banda em 1572 cm^{-1} e o surgimento da banda em 1407 cm^{-1} no espectro da região do infravermelho. Os hidrogéis de NCEQ/GAO (razão m/m 1:1) apresentaram tempos de gelificação entre 17 e 37 s, capacidade de intumescimento entre 109 e 399% em água e até 10% em tampão fosfato, e porosidade com valores de 37 a 76%. Observou-se que a porosidade aumenta com grau de oxidação de GAO. Os hidrogéis tiveram uma perda de massa entre 27,8 e 35,3% após 28 dias em degradação *in vitro*, com a perda aumentando com menor grau de oxidação. Os hidrogéis são viáveis para crescimento celular. Os resultados indicam potencial aplicação dos materiais como hidrogéis injetáveis.

Palavras-chave: Hidrogel. Goma Alfarroba. Quitosana.

ABSTRACT

Injectable hydrogels are a category of gels in which the precursors are applied directly to the desired site, where cross-linking occurs, with the aim of restoring injured tissue. Natural polymers are indicated for their synthesis because they present structures that resemble the extracellular matrix. Chitosan is a water-insoluble semi-synthetic polysaccharide, however its solubility can be increased with structural modifications, such as the insertion of the carboxyethyl group in its chain through the Michael addition reaction with acrylic acid. Locust bean gum is a galactomannan from the endosperm of *Ceratonia siliqua* seeds that has vicinal diols that can be oxidized via reaction with sodium periodate. This reaction produces a polyaldehyde that can bind to the amine groups of chitosan through the Schiff base reaction, resulting in cross-linking and hydrogel formation. This work proposes the preparation of injectable hydrogels formed by N-carboxyethyl chitosan (NCEQ) and oxidized locust bean gum (GAO). Locust bean gum was oxidized in three different theoretical oxidation degrees (10, 30 and 50%), which were characterized by FTIR, GPC and ^1H NMR. A band at 1728 cm^{-1} ($\nu\text{ C=O}$) in the FTIR spectrum confirmed the formation of aldehyde groups in the oxidized derivatives. The oxidation reaction resulted in a peak molar mass reduction of 86.3, 97.7 and 99.1% for oxidized gums 10, 30 and 50% respectively. This indicates that the reaction is accompanied by a degradation in the polymer chain. New peaks between 5.7 and 4.1 ppm were observed in the ^1H NMR spectrum, which are attributed to the formation of hemiacetal structures. The NCEQ formation reaction was confirmed by the increase in the relative intensity of the band at 1572 cm^{-1} and the appearance of the band at 1407 cm^{-1} in the spectrum of the infrared region. The NCEQ/GAO hydrogels (w/w ratio 1:1) presented gelation times between 17 and 37 s, swelling capacity between 109 and 399% in water and up to 10% in phosphate buffer, and porosity values ranging from 37 to 76%. It was observed that the porosity increases with the degree of oxidation of GAO. Hydrogels had a mass loss of between 27.8 and 35.3% after 28 days in in vitro degradation, with the loss increasing with a lower degree of oxidation. Hydrogels are viable for cell growth. The results indicate potential application of the materials as injectable hydrogels.

Keywords: Hydrogel. Locust Bean Gum. Chitosan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Número de publicações por ano entre o período de 2000-2020 segundo o <i>Web of Science</i> para a) hidrogéis e b) hidrogéis injetáveis	12
Figura 2	– a) Fruto, b) sementes, c) endospermas e d) goma alfarroba	14
Figura 3	– Estrutura da goma alfarroba	15
Figura 4	– Mecanismo da reação de oxidação do grupo manose da goma alfarroba pelo íon periodato	16
Figura 5	– Produtos da oxidação do grupo galactose da goma alfarroba	17
Figura 6	– a) Estrutura da quitina e b) estrutura da quitosana	18
Figura 7	– Estrutura da N-carboxietil quitosana	19
Figura 8	– Esquema descritivo da preparação dos hidrogéis de N-carboxetil quitosana (NCEQ) e goma alfarroba oxidada (GAO)	25
Figura 9	– Esquema reacional de uma unidade de manose oxidada com $\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$	29
Figura 10	– a) Curva da titulação entre derivados oxidados e NaOH 0,0985 mol/L e b) primeira derivada	30
Figura 11	– a) FTIR da goma alfarroba e derivados oxidados e b) região ampliada	31
Figura 12	– Cromatograma para goma alfarroba e derivados oxidados	32
Figura 13	– Espectros RMN ^1H a 70°C: a) GAO50 b) GAO30 c) GAO10 e d) GA	34
Figura 14	– Prótons das unidades galactose e manose na goma alfarroba	35
Figura 15	– Formação de um hemiacetal intramolecular na goma alfarroba oxidada	36
Figura 16	– FTIR da quitosana e N-carboxietil quitosana (NCEQ) em pastilha de KBr ...	37
Figura 17	– Reação de reticulação via base de Schiff entre a GAO e a NCEQ	38
Figura 18	– a) Evolução do módulo de armazenamento (G') e perda (G'') com o tempo para todos os hidrogéis a 37 °C, frequência de 1 Hz e tensão de cisalhamento 5 Pa. E regiões ampliadas com o tempo de cruzamento entre os módulos para b) NCEQ-GAO10, c) NCEQ-GAO30 e d) NCEQ-GAO50	39

Figura 19	– FTIR dos precursores NCEQ e GAO50 e do hidrogel NCEQ-GAO50 em pastilhas de KBr	40
Figura 20	– Valores de porosidade (%) dos hidrogéis com diferentes graus de oxidação da GA no ensaio de imersão em etanol a 25 °C	41
Figura 21	– Intumescimento dos hidrogéis durante um período de 3 horas em água destilada e em PBS pH 7,4	42
Figura 22	– Hidrogéis NCEQ-GAO30 após 3 horas de intumescimento em a) água e b) PBS	43
Figura 23	– Degradação <i>in vitro</i> dos hidrogéis em PBS pH = 7,4, durante 28 dias à 37 °C e 100 rpm	44
Figura 24	– Curvas termogravimétricas para: a) goma alfarroba e derivados oxidados, b) quitosana e NCEQ, c) hidrogéis; e gráficos de DTG em d), e) e f) respectivamente	45
Figura 25	– Percentual da viabilidade celular em células de fibroblasto murino L929 após 72 horas de incubação com os hidrogéis e os polissacarídeos precursores, determinado pelo método do MTT	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros da reação de oxidação da Goma Alfarroba (GA) com periodato de sódio	22
Tabela 2 – Resultados obtidos pela reação de oxidação da goma alfarroba	30
Tabela 3 – Volumes de eluição e massas molares de pico obtidos por GPC	33
Tabela 4 – Valores de deslocamento no espectro de RMN ^1H para goma alfarroba	35
Tabela 5 – Tempos de gelificação por ensaios reológicos (geometria cone-placa, frequência de 1 Hz e tensão de cisalhamento 5 Pa e temperatura de 37 °C) ..	40
Tabela 6 – Eventos térmicos observados nas curvas de TG e DTG para os hidrogéis e precursores	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier
G'	Módulo de perda
G''	Módulo de armazenamento
GA	Goma alfarroba
GAO	Goma alfarroba oxidada
GPC	Cromatografia de permeação em gel
M _{pk}	Massa molar de pico
NCEQ	N-carboxietil quitosana
PBS	Tampão fosfato-salino
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
t _{gel}	Tempo de gelificação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Hidrogéis injetáveis	12
1.2	Goma alfarroba	13
1.3	Quitosana	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Materiais	21
3.2	Goma alfarroba e seus derivados oxidados	21
3.2.1	<i>Purificação da goma alfarroba</i>	<i>21</i>
3.2.2	<i>Reação de oxidação da goma alfarroba</i>	<i>21</i>
3.2.3	<i>Determinação do grau de oxidação real por titulação potenciométrica</i>	<i>22</i>
3.2.4	<i>Estimativa da massa molar de pico por cromatografia de permeação em gel ..</i>	<i>23</i>
3.2.5	<i>Ressonância magnética nuclear</i>	<i>23</i>
3.3	Quitosana e N-carboxietil quitosana	23
3.3.1	<i>Purificação e caracterização da quitosana</i>	<i>23</i>
3.3.2	<i>Síntese da N-carboxietil quitosana (NCEQ)</i>	<i>24</i>
3.4	Hidrogéis injetáveis	24
3.4.1	<i>Preparação dos hidrogéis injetáveis</i>	<i>24</i>
3.4.2	<i>Tempo de gelificação</i>	<i>25</i>
3.4.3	<i>Porosidade</i>	<i>25</i>
3.4.4	<i>Intumescimento</i>	<i>26</i>
3.4.5	<i>Teste de degradação in vitro</i>	<i>26</i>
3.4.6	<i>Análise termogravimétrica</i>	<i>27</i>
3.4.7	<i>Ensaio de citotoxicidade in vitro</i>	<i>27</i>
3.5	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	Caracterização da goma alfarroba e derivados oxidados	29
4.1.1	<i>Grau de oxidação real dos derivados oxidados</i>	<i>29</i>

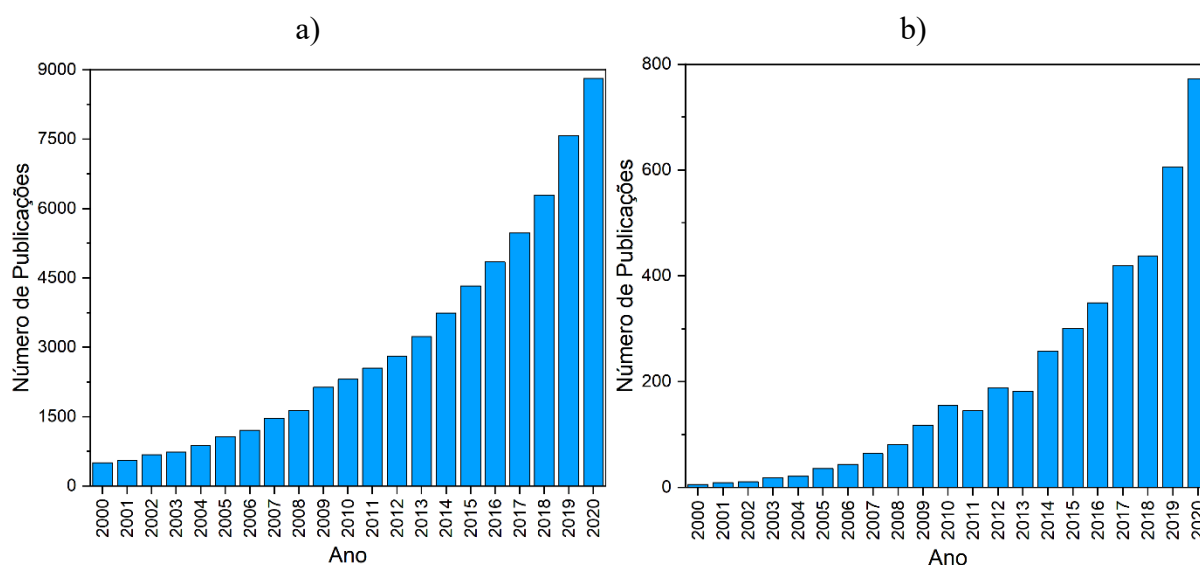
4.1.2	<i>FTIR da goma alfarroba e derivados oxidados</i>	30
4.1.3	<i>Cromatografia de permeação em gel</i>	32
4.1.4	<i>Ressonância magnética nuclear</i>	33
4.2	Caracterização da N-carboxietil quitosana	36
4.2.1	<i>FTIR da quitosana e N-carboxietil quitosana</i>	36
4.3	Preparação e caracterização dos hidrogéis injetáveis	37
4.3.1	<i>Tempo de gelificação</i>	38
4.3.2	<i>FTIR do hidrogel</i>	40
4.3.3	<i>Porosidade</i>	41
4.3.4	<i>Intumescimento</i>	42
4.3.5	<i>Teste de degradação in vitro</i>	43
4.3.6	<i>Análise termogravimétrica</i>	44
4.3.7	<i>Ensaio de citotoxicidade in vitro</i>	46
5	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hidrogéis injetáveis

Em 1960, os hidrogéis foram apresentados pela primeira vez por Wichterle e Lim, os quais introduziram o uso de redes hidrofílicas de poli(2-hidroxietil metacrilato) reticulado como material para lentes de contato gelatinosas (VLIERBERGHE, 2011). Durante as últimas décadas o interesse em hidrogéis tem aumentado constantemente, como indicado pelo número de artigos publicados do assunto (Figura 1).

Figura 1 – Número de publicações por ano entre o período de 2000-2020 segundo o *Web of Science* para a) hidrogéis e b) hidrogéis injetáveis



Fonte: Adaptado de Web of Science, 2021

Hidrogéis são definidos como uma estrutura tridimensional que pode absorver e conter grandes quantidades de água ou fluidos corporais. Sua rede polimérica pode ser formada por ligações químicas, interações físicas ou ambas. Os hidrogéis formados por interações físicas como ligações de hidrogênio ou iônicas, são estruturalmente frágeis e sua gelificação é reversível. Já hidrogéis formados via ligações covalentes possuem uma estrutura mais forte e sua gelificação é irreversível (NGUYEN *et al.*, 2015).

Os hidrogéis podem ser utilizados na forma de suportes pré-formados (scaffolds), em que a reticulação é feita em um molde na forma da lesão ou cavidade, e em seguida são implantados por meio de cirurgia aberta. Já os hidrogéis injetáveis são formados *in situ*, onde

os precursores são injetados diretamente no local da lesão e a reticulação ocorre preenchendo a cavidade (MELLATI e AKHTARI, 2019). A aplicação de hidrogéis por injeções tem diversas vantagens sobre hidrogéis pré-formados. É um procedimento menos invasivo, levando à diminuição do desconforto do paciente e um menor tempo de recuperação, apresenta menores custos, e o gel se adapta à forma da lesão levando a uma melhor recuperação tecidual (DIMATTEO *et al.*, 2018).

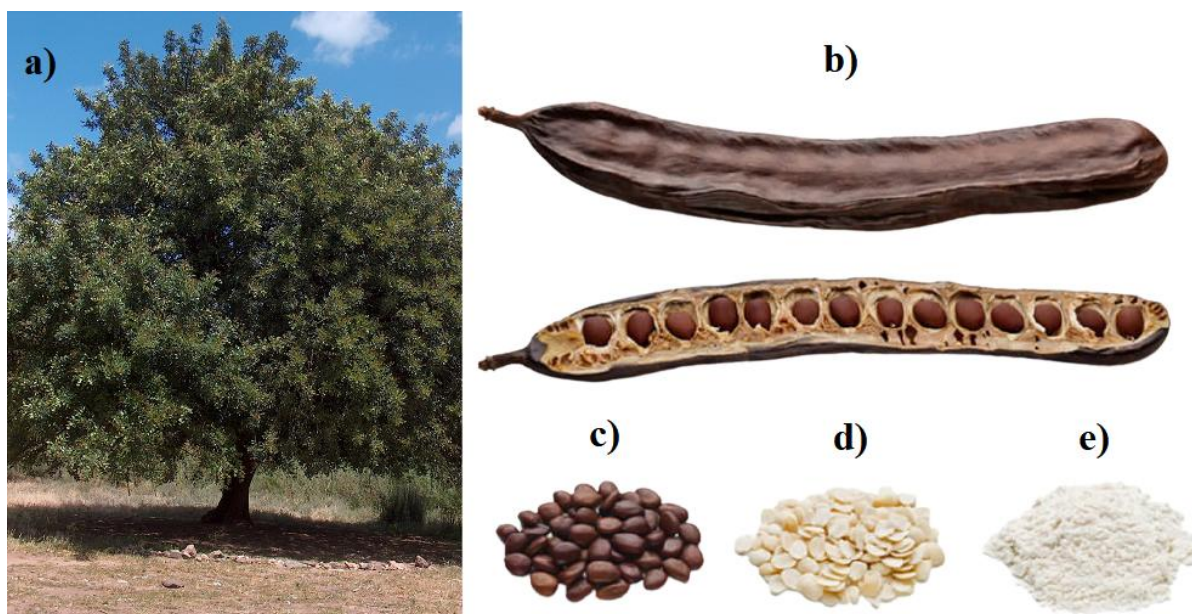
Geralmente, hidrogéis injetáveis são preparados com polímeros sintéticos ou naturais biodegradáveis. Devido a sua similaridade com a matriz extracelular, biocompatibilidade e biodegradabilidade, os hidrogéis formados com polímeros naturais são bons candidatos para utilização na engenharia de tecidos. Eles promovem a recuperação de tecidos devido a sua capacidade de difundir nutrientes, oxigênio e apresentam conformação compatível com a proliferação celular. As propriedades mecânicas do hidrogel como: rigidez, tamanho de poros, intumescimento e velocidade de degradação devem ser ajustadas para minimizar a irritação mecânica e dano ao tecido durante a administração (THAMBI *et al.*, 2016).

Dentre os hidrogéis formados via ligações químicas, existem diversas formas de reticulação. Uma dessas é a reação de formação da base de Schiff, que não necessita de nenhum agente reticulante. Esta reação ocorre entre grupos amina e grupos aldeído, e a razão entre esses grupos determinará o tempo de gelificação e propriedades físicas desses hidrogéis. É relatado na literatura que hidrogéis formados por base de Schiff a partir de polímeros naturais apresentam viabilidade celular, como hidrogéis de galactomanana de *Delonix regia* oxidada e N-succinil-quitosana (LIMA *et al.*, 2019) e goma do cajueiro oxidada e carboxietil quitosana (FERREIRA *et al.*, 2021).

1.2 Goma alfarroba

A goma alfarroba (GA), também conhecida como locusta ou caroba, é vendida comercialmente como um pó com coloração branca à levemente amarelada. É derivada do endosperma de sementes da alfarrobeira (*Ceratonia siliqua*), uma árvore originária da região mediterrânea. A semente é composta pela casca (30-33%), endosperma (42-46%) e germe (23-25%) (NEUKON, 1988). A Figura 2 ilustra os componentes do fruto e a GA.

Figura 2 – a) Árvore, b) fruto, c) sementes, d) endospermas e e) goma alfarroba

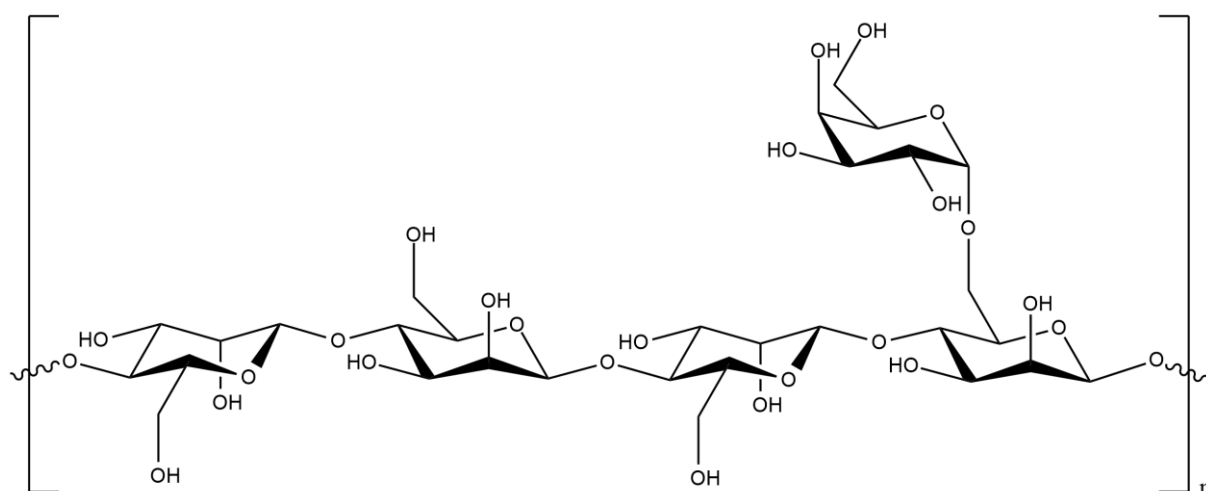


Fonte: Adaptado de Alimentaria Adin, 2021

Na produção industrial da goma alfarroba as sementes são separadas da polpa, e em seguida as cascas são removidas por processos termomecânicos ou tratamento químico com ácido sulfúrico diluído em altas temperaturas. No processo de descascamento termomecânico, os grãos são submetidos à aquecimento em forno rotativo, onde as cascas se soltam das porções internas. Após processamento mecânico, os endospermas separados são moídos e peneirados para obtenção da GA que possui coloração um pouco escura devido ao aquecimento. A clarificação é realizada pela dissolução por aquecimento da goma em água, seguida de uma filtragem para remoção da porção insolúvel, a goma é então precipitada com isopropanol ou etanol, filtrada, seca e moída. Já no processamento com ácido, a porção restante de casca é removida por lavagem e escovação, os grãos são então secos e quebrados, o germe é esmagado e separado por peneiração. (BARAK e MUDGIL, 2014).

A goma alfarroba é uma galactomanana, que são polissacarídeos lineares formados por uma cadeia de unidades β -D-manopiranosídicas unidas por ligações (1 \rightarrow 4), que são parcialmente substituídas por grupos laterais α -D-galactopiranosídicas ligadas (1 \rightarrow 6) à cadeia principal (SILVA e GONÇALVES, 1990) (Figura 3).

Figura 3 – Estrutura da goma alfarroba



Fonte: Próprio autor

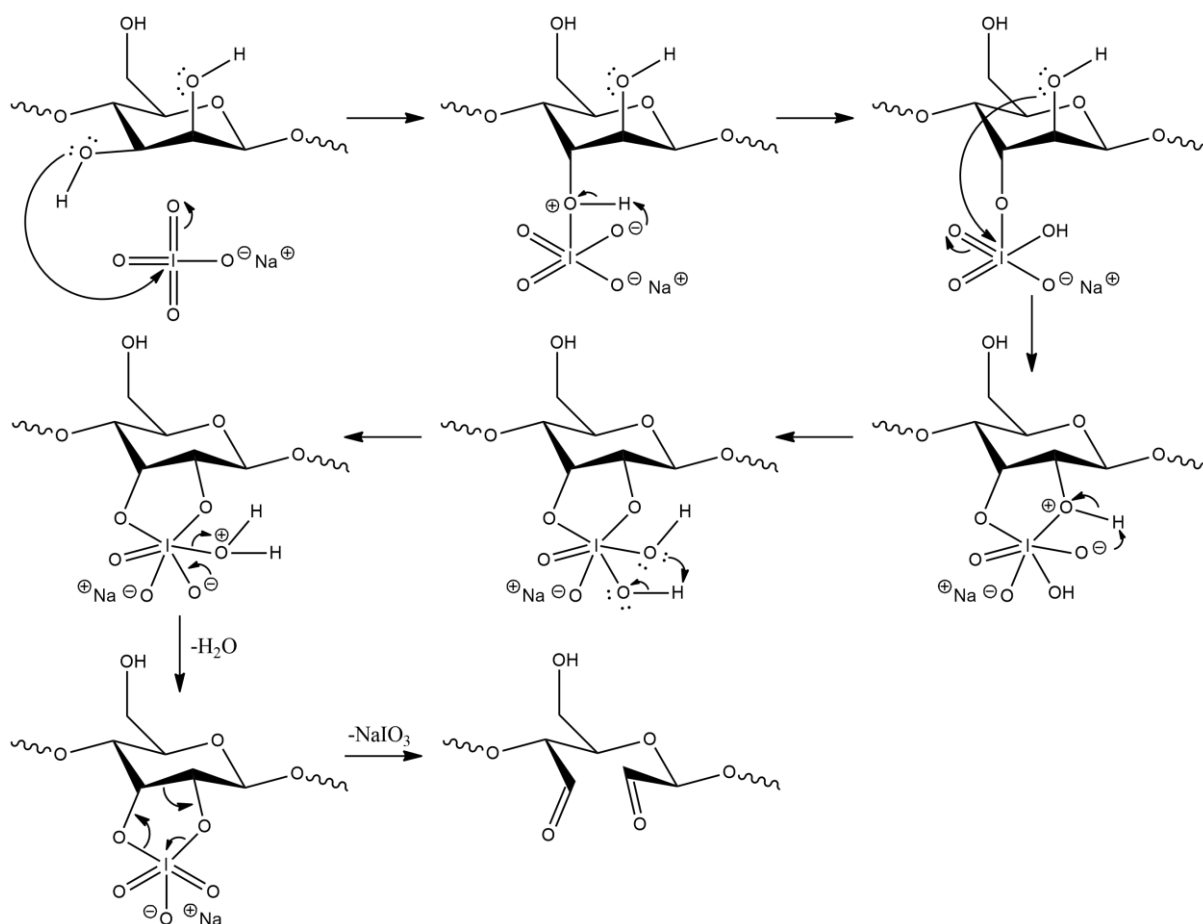
Existem vários tipos de galactomananas, que podem ser diferenciadas pela razão manose/galactose, padrão de substituição das cadeias laterais e massa molar. A razão M/G é de aproximadamente 3,5:1 para a goma alfarroba (SILVA *et al.*, 2020), 3:1 para goma tara e 2:1 para goma guar. A razão entre as unidades monossacarídicas é o principal fator que influencia a solubilidade de galactomanana (PRAJAPATI *et al.*, 2013). A solubilidade das galactomananas diminui com a redução da quantidade relativa de grupos galactose, isso pode ser explicado pela diminuição dos grupos hidroxila que são hidrofílicos. A diminuição desses grupos ramificados também favorece o maior empacotamento da cadeia principal, diminuindo a solubilidade. Por possuir a menor quantidade relativa de galactose dentre as galactomananas disponíveis comercialmente (~20%), a GA possui solubilidade parcial (~50%) à 25 °C. Para alcançar máxima solubilidade (~70-85%) é necessário o aquecimento à 80 °C por 30 minutos (DAKIA *et al.*, 2008).

Por ser um polissacarídeo natural, biodegradável, facilmente disponível, relativamente barato e que pode ser modificado, a goma alfarroba é um polímero bastante atrativo (PRAJAPATI *et al.*, 2013). Uma importante propriedade da GA é a capacidade de produzir soluções viscosas em baixas concentrações, sendo utilizada em produtos alimentícios como em sorvetes, sendo eficiente na estabilização de dispersões e emulsões e na substituição de gordura em muitos produtos laticínios. A goma alfarroba (GA) também é utilizada em outras indústrias, tais como: do papel, têxtil, farmacêutica e cosmética (DAKIA *et al.*, 2008). A sua baixa quantidade relativa de grupos galactose e cadeias laterais é o principal diferencial da goma alfarroba em relação a outras galactomananas, podendo resultar em diferentes propriedades nos hidrogéis produzidos.

Polissacarídeos podem ser submetidos a diversas modificações para diferentes propósitos. A carbamoiletilação, que é a substituição do grupo hidroxila (-OH) pelo grupo (-CH₂CH₂CONH₂) (SINGH *et al.*, 2020), carboximetilação (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016), sulfatação e carboxilação (BRAZ *et al.*, 2018), são alguns exemplos de modificações realizadas na goma alfarroba.

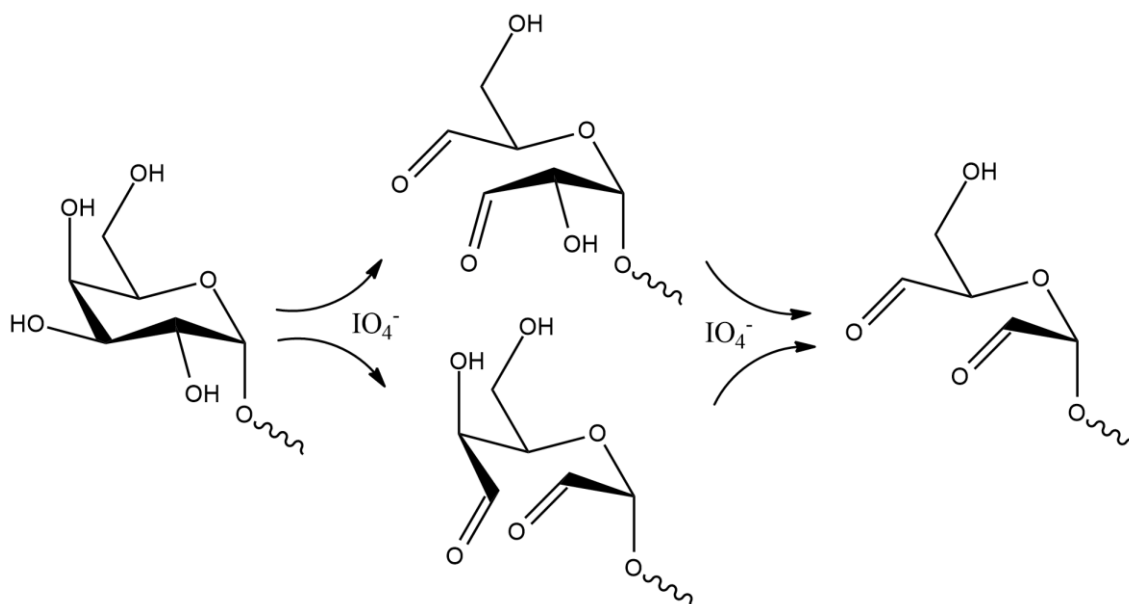
A reação de oxidação pelo íon periodato é realizada em meio aquoso sem necessidade de catalisadores e resulta em um produto purificado apenas com uma etapa de diálise. O íon periodato ataca dióis vicinais levando a quebra da ligação C–C e a formação de grupos aldeídicos (MAIA *et al.*, 2011). Na goma alfarroba, a reação de oxidação ocorre nos grupos –OH vizinhos que estão presentes nos carbonos C₂–C₃ em grupos manose (Figura 4). Nos grupos galactose pode ocorrer entre carbonos C₂–C₃, C₃–C₄ ou oxidação dupla (Figura 5).

Figura 4 – Mecanismo da reação de oxidação do grupo manose da goma alfarroba pelo íon periodato



Fonte: Próprio autor

Figura 5 - Produtos da oxidação do grupo galactose da goma alfarroba



Fonte: Adaptado de Maia *et al.*, 2011

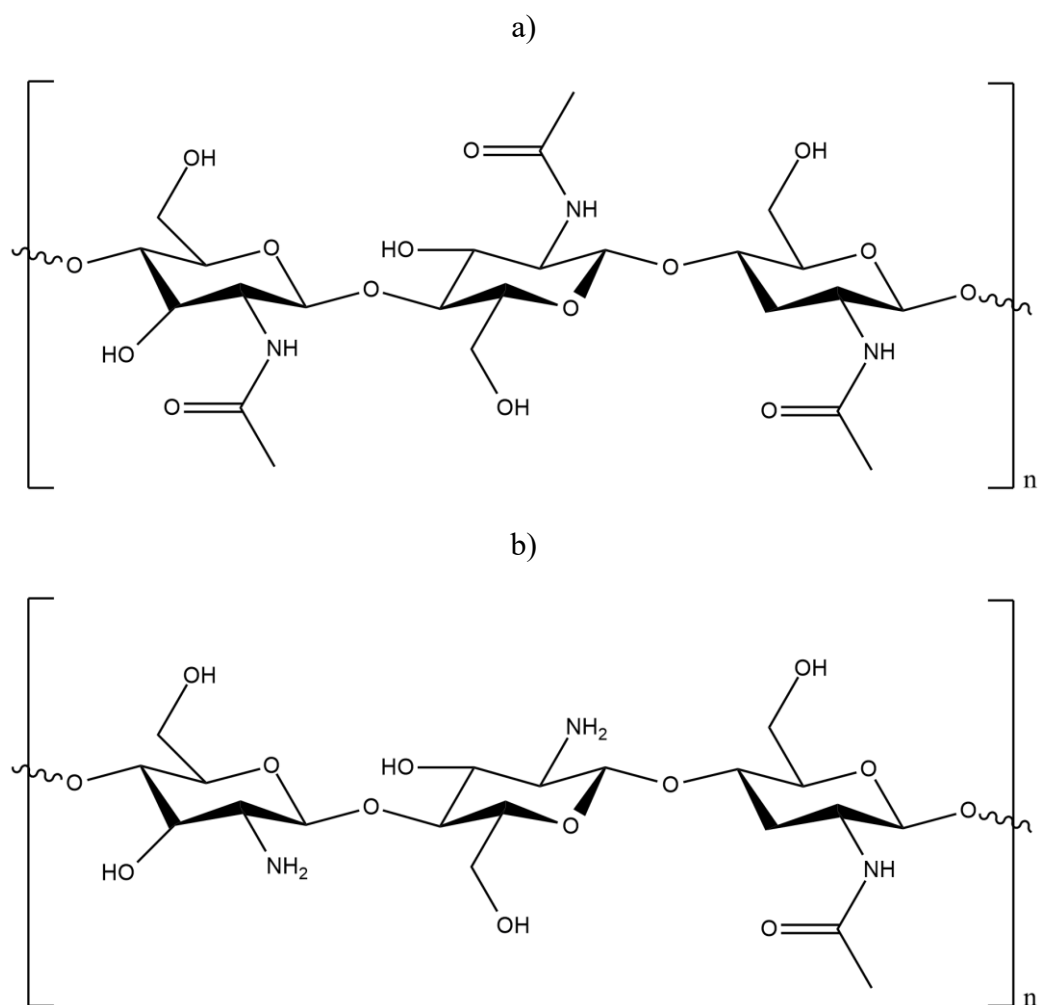
Assim com a inserção dos grupos aldeído na sua estrutura, a goma alfarroba oxidada pode ser utilizada para a formação de hidrogéis via reticulação base de Schiff com polissacarídeos que contenham grupos amina, como é o caso da quitosana.

1.3 Quitosana

A quitina é um polissacarídeo natural produzido por diversos organismos, sendo o segundo polímero mais abundante depois da celulose. A quitina constitui o exoesqueleto de artrópodes e paredes celulares de fungos (JAYAKUMAR *et al.*, 2010). A estrutura da quitina consiste em unidades β -(1,4)-N-acetil-D-glicosamina (Figura 6a).

A quitosana é um derivado parcialmente desacetilado da quitina, consistindo de unidades N-acetil-D-glicosamina e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose ligadas β -(1,4) (Figura 6b). A unidade desacetilada normalmente consiste em mais de 80% das unidades totais. A quitosana é obtida por meio da desacetilação da quitina utilizando-se hidróxido de sódio, aquecimento à 120 °C com a remoção de oxigênio do meio. A quitosana é atóxica, biocompatível e biodegradável. Degrada-se lentamente em amino açúcares que são absorvidos completamente pelo corpo, sendo um biomaterial apropriado para a engenharia de tecidos (BAKSHI *et al.*, 2020).

Figura 6 – a) Estrutura da quitina e b) estrutura da quitosana



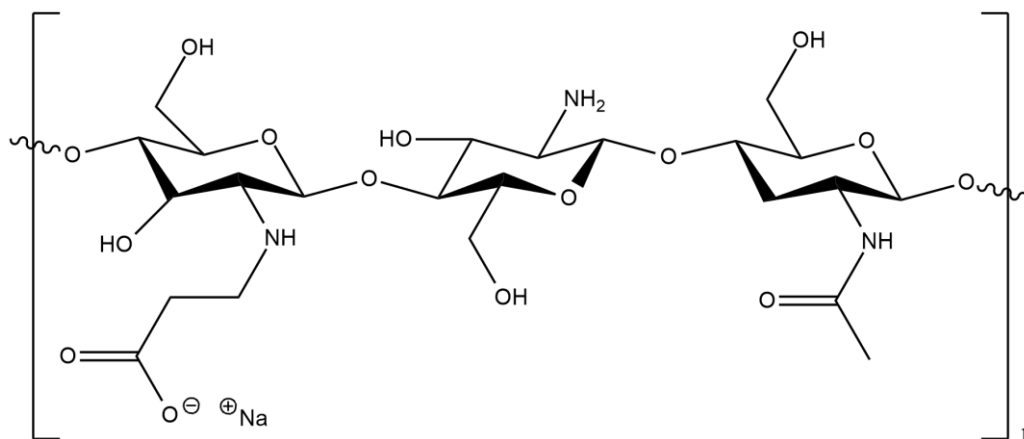
Fonte: Próprio autor

Embora a quitosana apresente várias propriedades compatíveis para uso como biomaterial, o principal fator limitante de seu uso é sua solubilidade apenas em meios ácidos $\text{pH} < 6$. O pH do meio fisiológico é 7,4, em que a quitosana é insolúvel, sendo assim necessárias modificações na sua estrutura. Diversas modificações da quitosana foram relatadas, dentre elas tem-se as modificações via adição de Michael, como: introdução do grupo sulfonato de sódio (JIANG *et al.*, 2010), síntese da (metacriloiloxi)-etil-carboxietil quitosana (GAO *et al.*, 2010), hidroxietilacril-quitosana (MA *et al.*, 2008), dentre outras.

Neste trabalho para tornar a quitosana solúvel em água, a modificação via adição de Michael foi realizada por meio da reação com ácido acrílico. Na síntese da N-carboxietil quitosana o grupo amina da quitosana age como doador de Michael e o carbono β do ácido acrílico como acceptor de Michael, formando assim o aduto na forma protonada ($-\text{COOH}$). Em

seguida é adicionado o hidróxido de sódio, que desprotona o grupo carboxila formando o grupo carboxilato ($-\text{COO}^-$). A Figura 7 apresenta a estrutura do derivado.

Figura 7 – Estrutura da N-carboxietil quitosana



Fonte: Próprio autor

A reação da quitosana com ácido acrílico é simples e efetiva para formação do derivado solúvel. Além disso, a reação é realizada em meio aquoso e o produto formado não é tóxico (YANG *et al.*, 2016). Assim, a N-carboxietil quitosana é um precursor promissor para produção de hidrogéis injetáveis.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter hidrogéis injetáveis a partir de N-carboxietil quitosana e goma alfarroba oxidada para potencial uso na engenharia de tecidos.

2.2 Objetivos específicos

Obter a N-carboxietil quitosana (NCEQ) através da reação de adição de Michael, tornando a quitosana hidrossolúvel. Confirmar a modificação por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR).

Obter a goma alfarroba oxidada (GAO) em três diferentes graus de oxidação a partir da reação com periodato de sódio (NaIO_4). Confirmar as modificações por meio de FTIR e RMN. Analisar a influência da reação de oxidação na massa molar de pico por meio da cromatografia de permeação em gel (GPC).

Produzir hidrogéis injetáveis por reticulação via formação de base de Schiff entre a NCEQ e os derivados oxidados da GA. Caracterizar os hidrogéis por meio de ensaios de intumescimento, degradação, porosidade, citotoxicidade, ensaio termogravimétrico e FTIR. Utilizar ensaios reológicos para obter o tempo de gelificação (t_{gel}).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A goma alfarroba das sementes da *Ceratonia siliqua* foi obtida da Sigma-Aldrich (Lote: 87F-0742). A quitosana foi cedida pela Polymar, e possui grau de desacetilação de 81%, que foi determinado por RMN. Álcool etílico (PA), acetona (PA) e ácido acrílico foram obtidos pela Synth. Etilenoglicol, cloridrato de hidroxilamina, hidróxido de sódio, fosfato de sódio dibásico e fosfato de potássio monobásico foram obtidos pela Vetec e o periodato de sódio pela Dinâmica.

3.2 Goma alfarroba e seus derivados oxidados

3.2.1 Purificação e caracterização da goma alfarroba

O processo de purificação da goma alfarroba foi realizado segundo a metodologia descrita em Silva e Gonçalves (1990) com algumas modificações. Uma massa 10,00 g de GA foi adicionada gradualmente em 1 L de água destilada com agitação. A dispersão foi agitada por 1 hora em temperatura ambiente, em seguida foi aquecida à 80 °C por 30 minutos com agitação contínua. Após um período de 24 horas em 25 °C com agitação, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 6000 rotações por minuto (rpm). Foi então adicionado o sobrenadante ao etanol em proporção 2:1 (etanol/sobrenadante) para ocorrer a precipitação. O precipitado foi filtrado em funil de placa sinterizada, e lavado com etanol e acetona. Em seguida, foi seco com jato de ar quente e macerado para obtenção de um pó fino. A goma foi caracterizada por GPC e RMN segundo as metodologias descritas nos itens 3.2.4 e 3.2.5.

3.2.2 Reação de oxidação da goma alfarroba

A reação de oxidação parcial da goma alfarroba seguiu a metodologia descrita em Silva *et al.* (2020) com algumas modificações. Foram adicionados 3,00 g de GA purificada a 600 mL de água destilada (1% m/v), em agitação por 1 hora em temperatura ambiente, em seguida 30 minutos à 80 °C e por fim mais 24 horas em temperatura ambiente.

Após esse período foram adicionadas diferentes quantidades (Tabela 1) de periodato de sódio (NaIO₄) para obtenção de graus de oxidação teóricos de 10, 30 e 50% das unidades

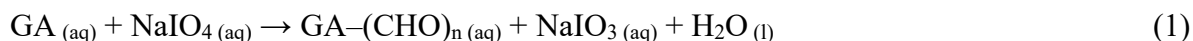
monossacarídicas (162 g/mol). O sistema foi mantido em agitação por 24 horas após ser coberto com folhas de papel alumínio para impedir a decomposição fotoinduzida do íon periodato (DAWLEE *et al.*, 2005).

Tabela 1 - Parâmetros da reação de oxidação da Goma Alfarroba (GA) com periodato de sódio

Derivado	Grau de oxidação teórico (%)	NaIO ₄ (mol)	GA (mol da un. monossacarídica)
GAO10	10	$1,9 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-2}$
GAO30	30	$5,6 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-2}$
GAO50	50	$9,3 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-2}$

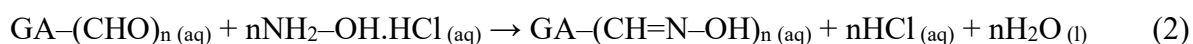
Fonte: próprio autor

Após esse período foi adicionado 1 mL de etilenoglicol para encerrar a reação. A solução foi então dialisada contra água destilada com uma membrana de celulose (limite de exclusão: 12.400 g/mol), até a condutividade se tornar próxima à da água destilada. O derivado foi seco por liofilização. A reação ocorre segundo a Equação 1:



3.2.3 Determinação do grau de oxidação real por titulação potenciométrica

Para determinação do grau de oxidação real dos derivados, foi seguido o procedimento descrito em Zhao *et al.* (1991). Essa análise indica a quantidade de grupos aldeído presentes na estrutura da GAO10, GAO30 ou GAO50. Uma massa de 100 mg do derivado oxidado foi dissolvida em 25 mL de uma solução 0,25 mol/L de cloridrato de hidroxilamina (NH₂OH.HCl), e mantida em agitação por 24 horas. Após esse período os grupos aldeído são convertidos em oximas e ocorre a liberação de ácido clorídrico (Equação 2), que foi então titulado com uma solução de NaOH 0,0985 mol/L (Equação 3).



O grau de oxidação real é então obtido pela Equação 4, em que C_{NaOH} e V_{NaOH} são a concentração (mol/L) e volume (L) de hidróxido de sódio, m_{GAO} é a massa (g) do derivado oxidado e 162 g/mol é a massa molar da unidade monossacarídica de galactose ou manose.

$$\text{Grau de oxidação real (\%)} = \frac{C_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \times 162 \text{ g/mol}}{2 \times m_{\text{GAO}}} \times 100 \quad (4)$$

3.2.4 Estimativa da massa molar de pico por cromatografia de permeação em gel

Para estimar a massa molar de pico (M_{pk}) por meio da cromatografia de permeação em gel (GPC) foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu LC-20AD, com detector de índice de refração RID-10A. As amostras foram dissolvidas em água na concentração de 1,0 mg/mL e filtradas em membrana Millipore 0,45 μm . Um volume de 50 μL das soluções foi então injetado em uma coluna linear Polysep (7,8 mm \times 300 mm), com fluxo de 1,0 mL/min da solução aquosa de nitrato de sódio (NaNO_3) (0,1 mol/L). Uma curva de pululanas (Shodex P-82), com massa molar na faixa de $5,90 \times 10^3$ a $7,88 \times 10^5$ g/mol, foi utilizada como padrão para estimar a massa molar de pico da GA e dos derivados oxidados.

3.2.5 Ressonância magnética nuclear

Para obtenção dos espectros de RMN, a goma alfarroba e os derivados oxidados foram dissolvidos em água deuterada contendo DSS (1%). Os espectros de ^1H foram obtidos utilizando o espectrômetro Bruker (Avance DRX 500), na temperatura de 70 $^\circ\text{C}$ e com o DSS (trimetilsililpropanossulfonato de sódio) como padrão para o deslocamento químico.

3.3 Quitosana e N-carboxietil quitosana

3.3.1 Purificação da quitosana

A quitosana foi purificada por meio do método descrito por Nasti *et al.* (2009), com algumas modificações. Uma massa de 15,00 g de quitosana foi dissolvida em 1 L de ácido acético 2% (V/V), e mantida em agitação por 24 h. Em seguida a solução foi filtrada em funil N° 3 e mantida a 100 $^\circ\text{C}$ por 15 minutos para desnaturar e precipitar contaminantes proteicos. A solução foi então centrifugada por 30 minutos a 6000 rpm e o sobrenadante obtido foi

precipitado com o ajuste do pH para 9 com NaOH 1 mol/L. A suspensão foi centrifugada e a quitosana precipitada foi lavada com água destilada para retirar o NaOH restante. A amostra foi liofilizada e armazenada a 4 °C.

3.3.2 Síntese da *N*-carboxietil quitosana (NCEQ)

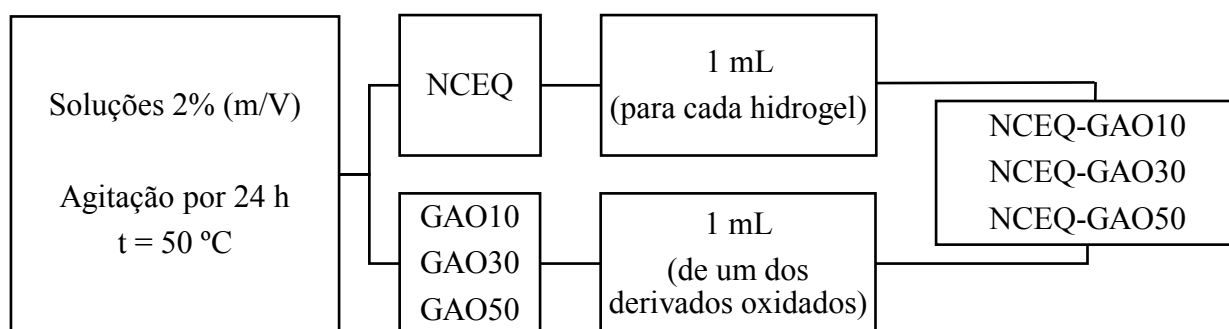
O derivado da quitosana solúvel em água foi sintetizado de acordo com Ferreira *et al.* (2021), para obtenção de um grau de substituição teórico de 12,5%. Em um balão de fundo redondo foram adicionados 50 mL de água destilada, 0,365 mL de ácido acrílico e em seguida 1,00 g de quitosana purificada. O sistema foi mantido em agitação constante por 72 horas a 50 °C em banho de glicerina. Após esse período o pH foi ajustado para 10-12 com uma solução de NaOH 1 mol/L. Em seguida a solução foi precipitada em etanol comercial, lavada com etanol e acetona PA e o sólido seco por jato de ar quente.

3.4 Hidrogéis injetáveis

3.4.1 Preparação dos hidrogéis injetáveis

Soluções aquosas 2% (m/V) de NCEQ, GAO10, GAO30 e GAO50 foram preparadas em agitação magnética a 50 °C por 24 h. Após esse período a temperatura foi reduzida para 37 °C e foram pipetados 1 mL da solução de NCEQ e 1 mL de um dos derivados oxidados (GAO), para formação de hidrogéis com razão volumétrica 1:1. Foram assim produzidos três diferentes hidrogéis (Figura 8) com diferentes graus de oxidação da GA. Eles foram preparados e armazenados em frascos cilíndricos com 2,5 cm de diâmetro e 3,5 cm de altura. Os frascos foram mantidos em temperatura ambiente por 24 h para completa reticulação.

Figura 8 – Esquema descritivo da preparação dos hidrogéis de N-carboxetil quitosana (NCEQ) e goma alfarroba oxidada (GAO)



Fonte: próprio autor

3.4.2 Tempo de gelificação

Por reologia o tempo de gelificação foi determinado pelo *crossover*, que é o tempo no qual as curvas dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') cruzam. Foi utilizado um reômetro AR 550 da TA Instrument com os seguintes parâmetros: geometria cone-placa (diâmetro 40 mm, ângulo 1° , gap $28\ \mu\text{m}$), frequência de 1 Hz e tensão de cisalhamento 5 Pa e temperatura de 37°C . Foram pipetadas $100\ \mu\text{L}$ das soluções (2% m/V) dos precursores (NCEQ + GAO) no equipamento, e as medições iniciaram cerca de 30 segundos após as soluções entrarem em contato.

3.4.3 Porosidade

Para a realização dos testes de porosidade, os hidrogéis formados previamente foram mantidos a -80°C em ultra low temperature freezer Nuair por 24 h e em seguida liofilizados. A porosidade foi então calculada por meio do método de infiltração de etanol absoluto (SARKER *et al.*, 2016). O etanol é utilizado como líquido de deslocamento, pois não interfere na estrutura tridimensional dos géis, apenas se infiltra facilmente nos espaços vazios. O diâmetro e altura das amostras dos hidrogéis foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital. Em seguida as amostras foram imersas em etanol e centrifugadas por 10 min a 1200 rpm para acelerar o processo de infiltração. Após a centrifugação, o excesso de etanol foi removido com papel de filtro e os géis pesados. Esse processo foi repetido até a massa se tornar

constante. A análise foi realizada em triplicata. A porosidade foi então calculada pela Equação 5.

$$\text{Porosidade (\%)} = \frac{m_2 - m_1}{0,789 \text{ g/mL} \times V} \times 100 \quad (5)$$

em que m_2 é a massa em gramas após a imersão no etanol e m_1 a massa (g) do hidrogel seco, 0,789 g/mL é a densidade do etanol a 25 °C e V é o volume em mL do hidrogel.

3.4.4 Intumescimento

Os ensaios de intumescimento dos hidrogéis foram realizados em água destilada e em tampão fosfato pH 7,4 à temperatura ambiente. Cadinhos com placas porosas foram imersos em água ou tampão fosfato até a saturação da placa porosa, foram retirados e tiveram sua massa pesada. Os hidrogéis secos foram pesados e inseridos no cadinho, que por sua vez foram imersos em água ou tampão fosfato. O cadinho contendo o hidrogel foi retirado e pesado a cada 10 min na primeira hora, e a cada 30 min no restante do período até completar 3 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata. A massa do hidrogel intumescido foi calculado pela Equação 6, e o intumescimento foi obtido pela Equação 7.

$$m_{\text{int}} = m_{\text{cad2}} - m_{\text{cad1}} \quad (6)$$

$$\text{Intumescimento} = \frac{m_{\text{int}} - m_{\text{hid}}}{m_{\text{hid}}} \quad (7)$$

em que m_{int} é a massa do hidrogel intumescido, m_{cad2} é a massa do cadinho contendo o hidrogel intumescido, m_{cad1} a massa do cadinho e m_{hid} é a massa do hidrogel antes do intumescimento.

3.4.5 Teste de degradação *in vitro*

O perfil da degradação dos hidrogéis *in vitro* foi verificado segundo a metodologia descrita em Balakrishnan *et al.* (2017). Os hidrogéis secos por liofilização foram pesados e inseridos em recipientes contendo 30 mL de PBS (pH = 7,4). Utilizando uma incubadora, os

hidrogéis foram mantidos em 37 °C e com agitação constante de 100 rpm. As amostras foram retiradas nos períodos de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias após o início do ensaio. Os hidrogéis foram lavados com água destilada para remoção dos sais presentes no PBS, congelados, liofilizados e então pesados. A porcentagem de degradação foi obtida através da Equação 8:

$$\text{Degradação} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100\% \quad (8)$$

em que m_i é a massa inicial e m_f é a massa após o período de degradação.

3.4.6 *Análise termogravimétrica*

A análise termogravimétrica dos hidrogéis e de seus precursores foi realizada com o equipamento da SHIMADZU TGA-50, em atmosfera de ar sintético com fluxo de 50 mL/min. A faixa de temperatura analisada foi de 30-800 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min. Foram utilizados 10 mg de cada amostra e a análise foi realizada em cadinho de alumina.

3.4.7 *Ensaio de citotoxicidade in vitro*

A citotoxicidade *in vitro* dos hidrogéis e dos polissacarídeos precursores foram obtidos através do teste MTT (3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). Este teste baseia-se na capacidade das enzimas oxidorrredutase celulares dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para reduzir o brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT), de cor amarela, para o formazan que é um composto de cor púrpura (BERRIDGE *et al.*, 1996). Assim é realizada a quantificação indireta da porcentagem de células vivas.

As células não-tumorais de fibroblastos murinho L929 foram cultivadas em meio DMEM, suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Os extratos dos hidrogéis e dos polissacarídeos precursores foram preparados de acordo com a ISO 10993-5. Os hidrogéis foram seccionados em tamanho padronizados (1 cm²), enquanto 10,00 mg dos polissacarídeos precursores foram esterilizados utilizando radiação UV. Em seguida, utilizou-se meio de cultura DMEM como veículo de extração durante 24 horas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As células L929 foram então plaqueadas nas concentrações de 0,1 x 10⁶ cél/mL em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi retirado e adicionado

200 μL com os extratos dos hidrogéis e seus polissacarídeos precursores. As placas foram incubadas por 69 horas em estufa a 5% de CO_2 e 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), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 μL de DMSO puro em leitor de microplaca (Molecular Devices, Spectramax 190) sob o comprimento de onda de 595 nm. Os valores das absorbâncias foram transformados em viabilidade celular a partir dos valores de absorbância previamente normalizados com base na média da absorbância do controle negativo utilizando o programa GraphPadPrism versão 7.0.

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

Foram obtidos espectros na região do infravermelho na faixa de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ para: goma alfarroba e derivados oxidados, quitosana, N-carboxietil quitosana e hidrogéis liofilizados. O espectrômetro de infravermelho FTIR da Shimadzu IRTracer-100 foi o modelo utilizado para obtenção dos espectros. As amostras foram trituradas e misturadas a brometo de potássio (KBr) para preparação das pastilhas.

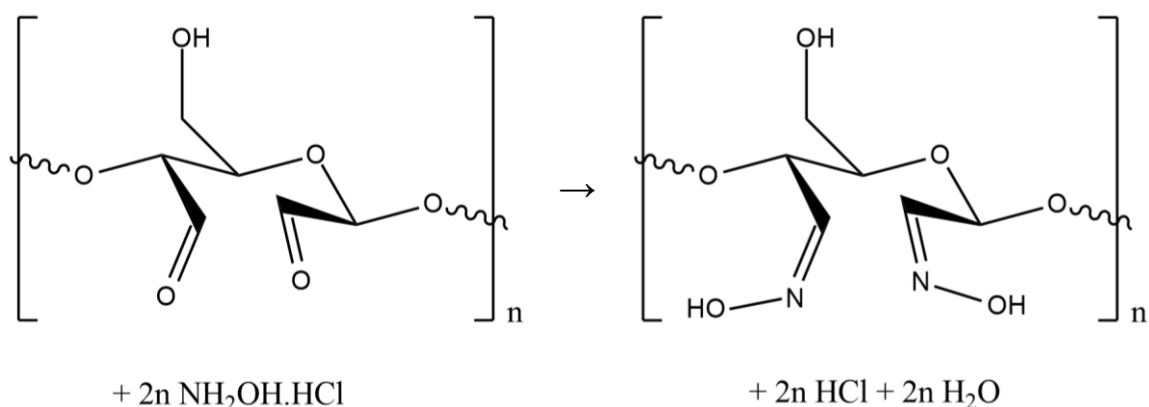
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da goma alfarroba e derivados oxidados

4.1.1 Grau de oxidação real dos derivados oxidados

Os derivados oxidados da goma alfarroba foram obtidos pela reação com NaIO_4 . O grau de oxidação foi expresso como a quantidade de unidades oxidadas por 100 unidades monossacarídicas totais, considerando dois grupos aldeídos por cada unidade. O teor de grupos aldeído foi então determinado pela titulação potenciométrica do HCl liberado durante a reação entre $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ com a goma alfarroba oxidada. A reação ocorre com o ataque nucleofílico do nitrogênio da hidroxilamina ao carbono do grupo aldeído, formando polioximas com ligações $\text{C}=\text{N}$, com água e ácido clorídrico como subprodutos (Figura 9). A goma alfarroba possui uma razão manose/galactose de 3,5:1, a reação de oxidação pode ocorrer em ambas as unidades.

Figura 9 – Esquema reacional de uma unidade de manose oxidada com $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$

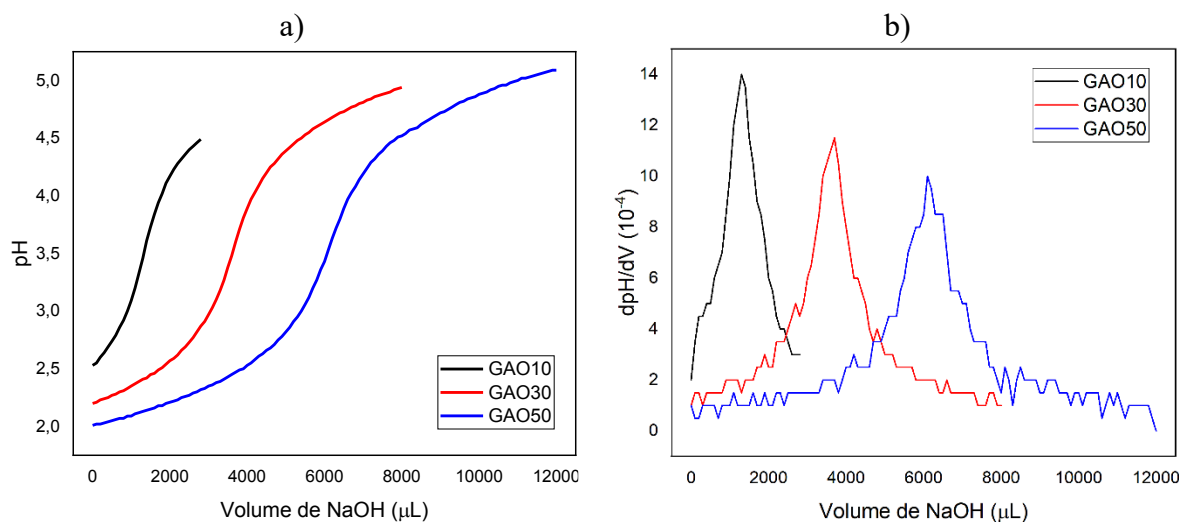


Fonte: próprio autor

A Figura 10 exibe as curvas de titulação potenciométrica entre os derivados oxidados após reação com cloridrato de hidroxilamina e NaOH , como também as curvas de primeira derivada da titulação. A Tabela 2 apresenta os graus de oxidação reais obtidos para os derivados. São observados valores bem próximos aos graus de oxidação teóricos. O rendimento das reações apresentaram valores um pouco inferiores (62-71%) aos encontrados na literatura para outros polissacarídeos oxidados: (75-90%) galactomanana de *Cassia fistula* oxidada (SILVA *et al.*, 2020), (79-85%) goma do cajueiro oxidada (FERREIRA *et al.*, 2021), (83-90%)

galactomanana de *Delonix regia* (RAMOS, 2016). Isso pode ser explicado pela baixa solubilização da goma alfarroba, que acarreta na formação de uma porção insolúvel após a reação de oxidação e da etapa de diálise. Essa porção insolúvel é removida antes da liofilização por filtração.

Figura 10 – a) Curva da titulação entre derivados oxidados e NaOH 0,0985 mol/L e b) primeira derivada



Fonte: próprio autor

Tabela 2 – Resultados obtidos pela reação de oxidação da goma alfarroba

Derivado	Volume de NaOH (μL)	Grau de oxidação (%)	Rendimento (%)
GAO10	1289	10,3 ± 0,3	62
GAO30	3596	28,7 ± 0,8	71
GAO50	5970	47,6 ± 2,0	71

Fonte: próprio autor

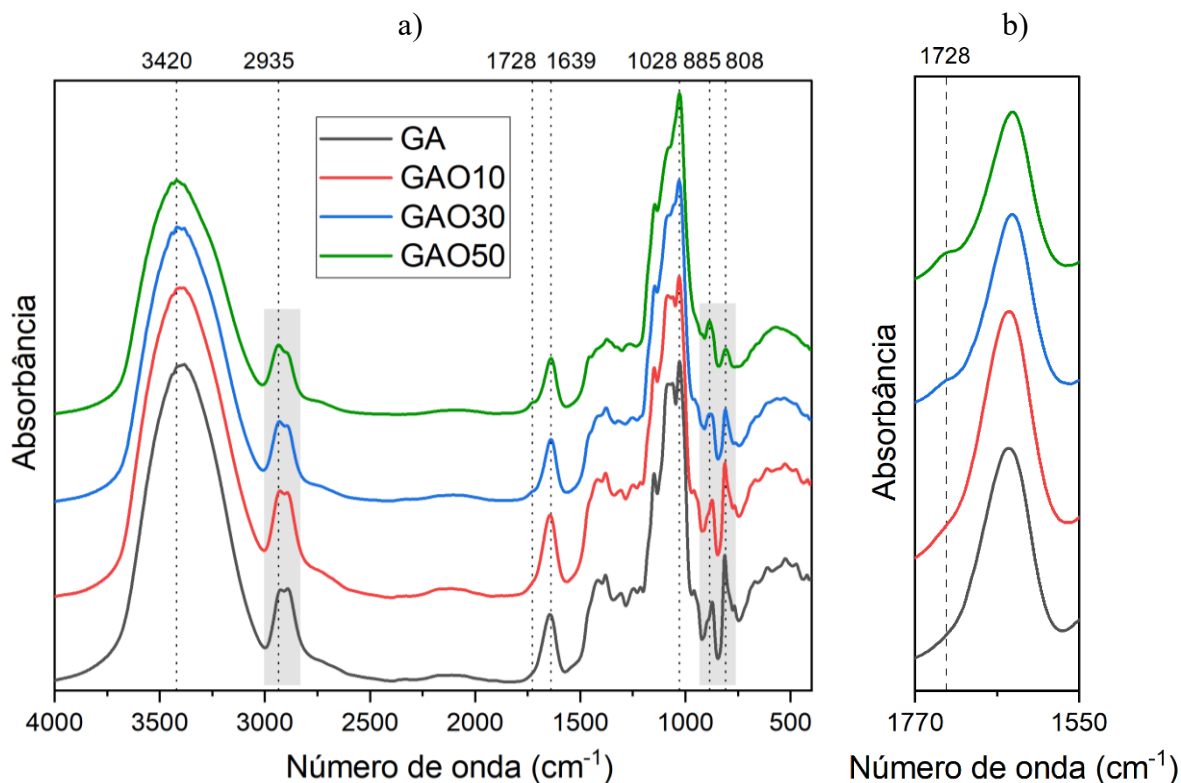
4.1.2 FTIR da goma alfarroba e derivados oxidados

A Figura 11a mostra os espectros na região do infravermelho da GA e dos derivados oxidados. O espectro da GA contém uma banda larga em 3420 cm⁻¹, que é atribuída ao estiramento vibracional dos grupamentos –OH, em 2935 cm⁻¹ é possível observar a banda do estiramento das ligações CH de carbonos sp³. Em 1639 cm⁻¹ é visível a banda associada com a presença de água (KOUTSIANITIS *et al.*, 2015). Já a banda em 1028 cm⁻¹ é atribuída ao

estiramento C–O–C (MURALI e THANIKAIVELAN, 2016). Em 820 e 867 cm^{-1} as bandas são atribuídas as ligações glicosídicas α -D-galactopirano e β -D-manopirano (FIGUEIRÓ *et al.*, 2004). As bandas presentes estão condizentes com a estrutura da goma alfarroba.

Nos espectros dos derivados oxidados GAO10, GAO30 e GAO50 estão presentes as bandas típicas dos polissacarídeos, acrescidas de uma banda de fraca intensidade em 1728 cm^{-1} (Figura 11b), que é atribuída ao estiramento da ligação C=O dos grupos aldeído, evidenciando-se assim a presença de unidades oxidadas. Normalmente grupos carbonílicos possuem bandas com alta intensidade em espectros na região do infravermelho. A fraca intensidade presente nos espectros dos derivados oxidados pode ser atribuída a formação de hemiacetais intramoleculares e intermoleculares e também de formas hidratadas do grupo aldeído. Também é possível observar que com o aumento do grau de oxidação ocorre o aumento de intensidade relativa das bandas em 2935 cm^{-1} e 885 cm^{-1} que estão relacionadas ao estiramento C–H de aldeído e estruturas hemiacetais, respectivamente.

Figura 11 – a) FTIR da goma alfarroba e derivados oxidados e b) região ampliada

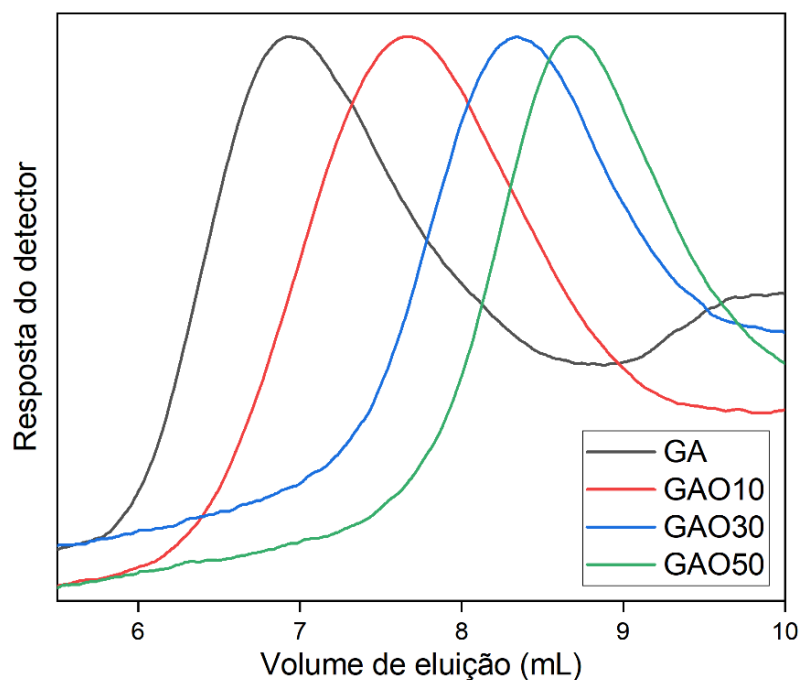


Fonte: próprio autor

4.1.3 Cromatografia de permeação em gel

A Figura 12 mostra o cromatograma de permeação em gel para a GA e os derivados oxidados. É possível observar que com o aumento do grau de oxidação ocorre um aumento no volume de eluição, indicando assim uma menor massa molar.

Figura 12 – Cromatograma para goma alfarroba e derivados oxidados



Fonte: próprio autor

A Tabela 3 apresenta os valores de massa molar de pico (M_{pk}) obtidos a partir da Equação 8 ($R = 0,992$), utilizando os valores de volume de eluição (V_e) obtidos no cromatograma.

$$\text{Log } M_{pk} = 14,52 - 1,17 \times V_e \quad (8)$$

Tabela 3 – Volumes de eluição e massas molares de pico obtidos por GPC

Amostra	Volume de eluição (mL)	M _{pk} (g/mol)
GA	6,93	2,67 x 10 ⁶
GAO10	7,67	3,65 x 10 ⁵
GAO30	8,34	6,02 x 10 ⁴
GAO50	8,69	2,35 x 10 ⁴

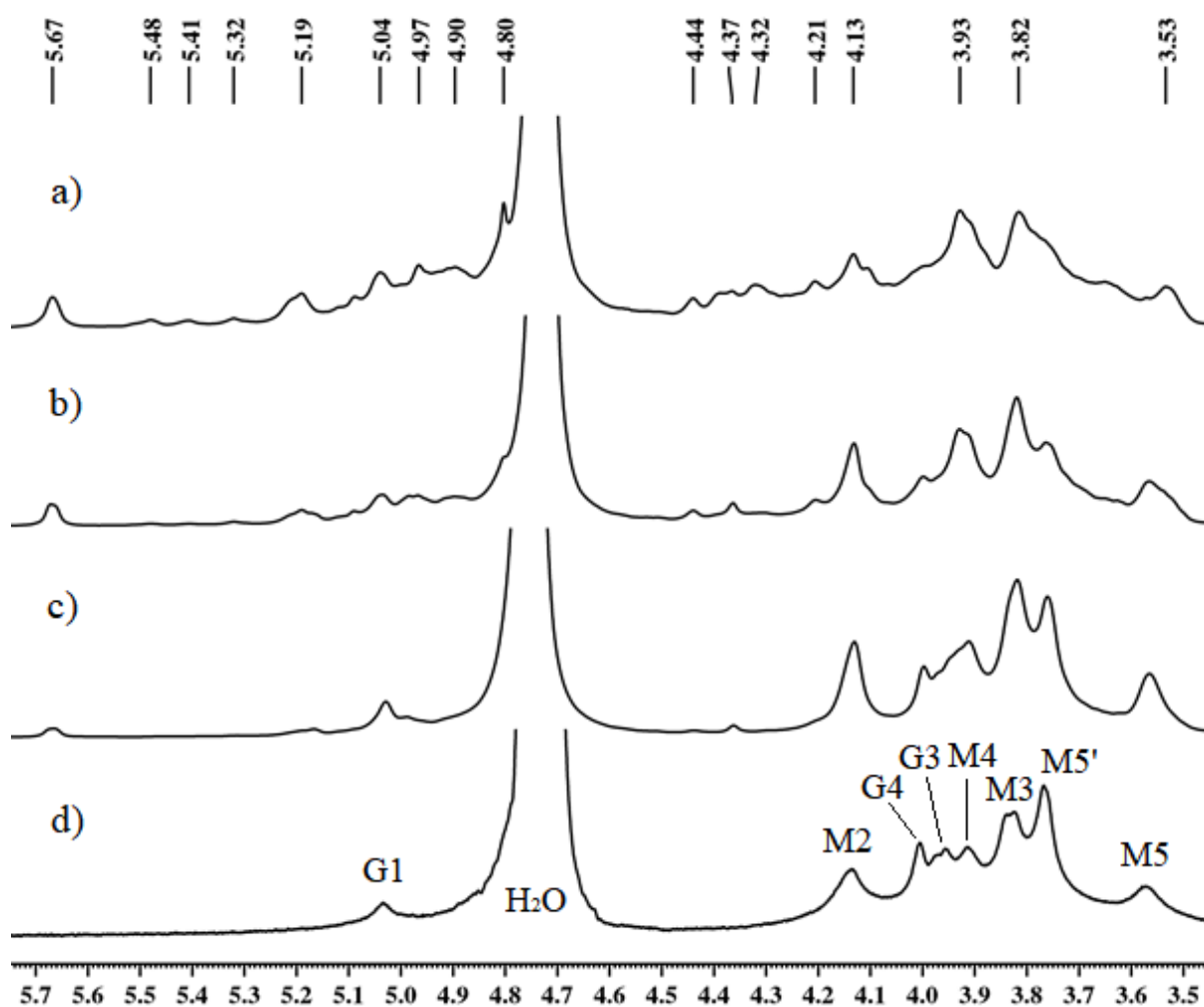
Fonte: próprio autor

Estes resultados indicam que houve uma extensa clivagem na cadeia principal dos derivados oxidados por meio da quebra das ligações glicosídicas, que aumenta com o grau de oxidação. Um comportamento similar foi observado na oxidação com periodato de sódio de galactomanana de *Cassia fistula*, com a massa molar de pico da galactomanana de 1,84 x 10⁶ g/mol e do derivado 50% oxidado de 1,64 x 10⁴ g/mol (SILVA *et al.*, 2020).

4.1.4 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN ¹H para a goma alfarroba e seus derivados oxidados são apresentados na Figura 13.

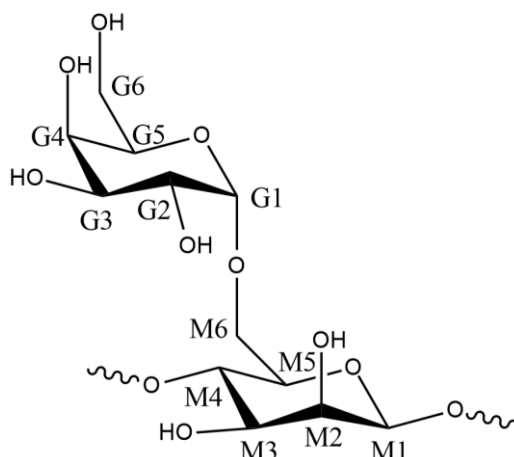
Figura 13 – Espectros RMN ^1H a 70°C: a) GAO50 b) GAO30 c) GAO10 e d) GA



Fonte: próprio autor

No espectro da goma alfarroba (Figura 13d), é possível observar os picos relatados em Muschin e Yoshida (2012), os prótons presentes nas unidades galactose e manose estão representados na Figura 14 e os valores de deslocamento na Tabela 4.

Figura 14 – Prótons das unidades galactose e manose na goma alfarroba



Fonte: próprio autor

Tabela 4 – Valores de deslocamento no espectro de RMN ^1H para goma alfarroba

δ (ppm)	Hidrogênio
5,04	G1
4,13	M2
4,01	G4
3,95	G3
3,92	M4
3,82	M3
3,77	M5'
3,57	M5

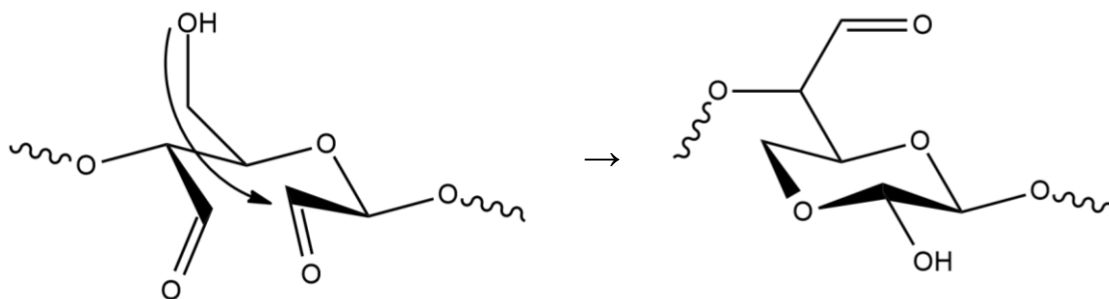
Fonte: Muschin e Yoshida (2012)

O deslocamento do próton em 3,77 ppm, indicado como M5', está relacionado a um próton ligado ao carbono 5 de uma unidade manose que não está ligada a uma unidade galactose. Outros picos foram sobrepostos como o do próton em M1 que foi sobreposto pelo pico relacionado à presença de água em cerca de 4,75 ppm.

Para os derivados oxidados foram observados novos picos entre 5,7 e 4,1 ppm, que estão relacionado à formação de hemiacetais como o apresentado na Figura 15. Estes

hemiacetais são formados entre os grupos hidroxila e aldeído e podem ser intramoleculares e intermoleculares (MAIA *et al.*, 2005).

Figura 15 – Formação de um hemiacetal intramolecular na goma alfarroba oxidada



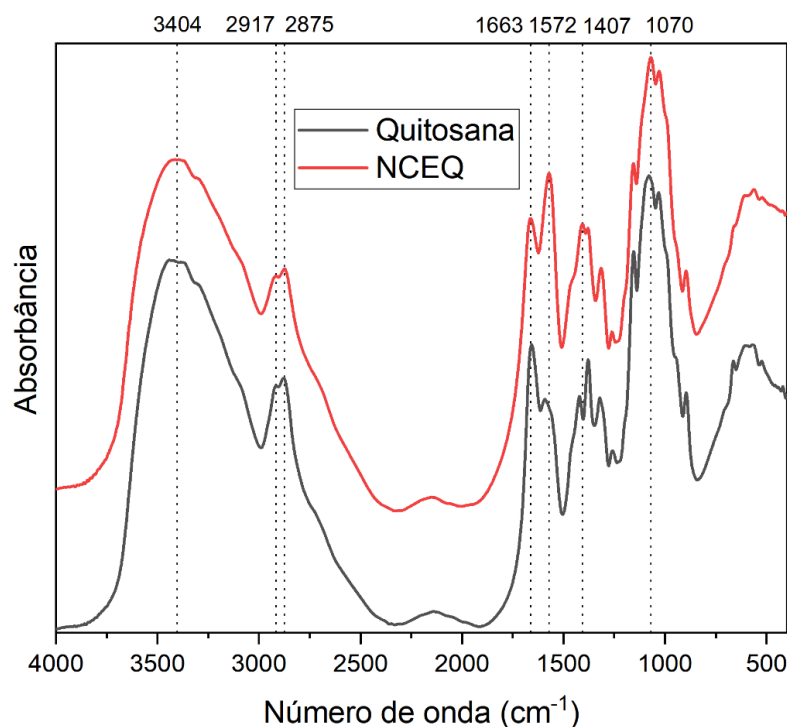
Fonte: Adaptado de Yu e Bishop, 1967

4.2 Caracterização da N-carboxietil quitosana

4.2.1 FTIR da quitosana e N-carboxietil quitosana

A Figura 16 exibe os espectros na região do infravermelho da quitosana e do derivado solúvel em água (NCEQ).

Figura 16 – FTIR da quitosana e N-carboxietil quitosana (NCEQ) em pastilha de KBr



Fonte: próprio autor

A quitosana apresenta uma banda larga centralizada em 3404 cm^{-1} que é atribuída ao estiramento das ligações OH, como também ao estiramento das ligações NH. As bandas em 2917 e 2875 cm^{-1} estão relacionadas ao estiramento das ligações C–H de carbono sp^3 . A banda em 1663 cm^{-1} está relacionada ao estiramento da ligação C=O da amida, que indica a presença de grupos N-acetil residuais. As bandas em 1154 , 1070 e 1032 cm^{-1} correspondem ao estiramento de ligações C–O (DUARTE *et al.*, 2002).

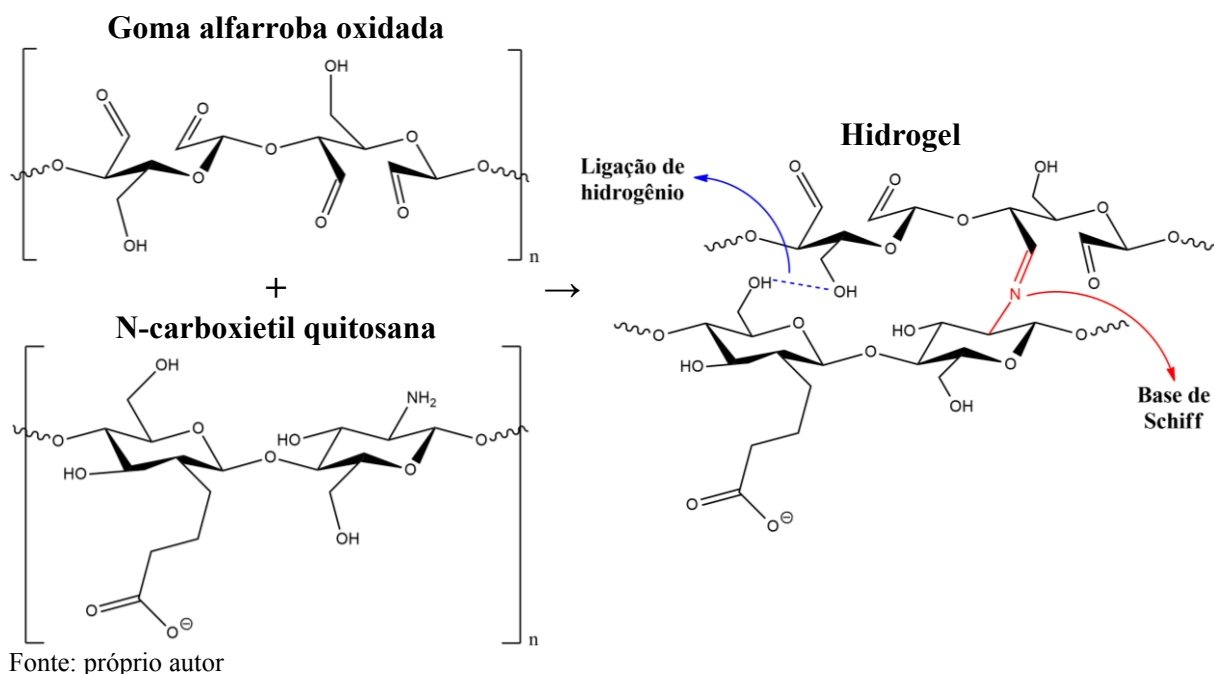
No espectro da N-carboxietil quitosana é possível observar as bandas indicadas no espectro da quitosana, como também o aumento da intensidade relativa da banda em 1572 cm^{-1} e o surgimento da banda em 1407 cm^{-1} , que são atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico do grupo COO^- (HUANG *et al.*, 2016). Essas bandas indicam que ocorreu a modificação por meio da reação com ácido acrílico para introdução do grupo carboxilato.

4.3 Preparação e caracterização dos hidrogéis injetáveis

O processo de reticulação para formação dos hidrogéis injetáveis ocorre entre os grupamentos aldeído obtidos pela oxidação da goma alfarroba e os grupos amino livres da N-carboxietil quitosana (Figura 17). Essa reação forma então uma base de Schiff (imina,

RR'C=NR'')) entre as cadeias dos polissacarídeos. Outras interações secundárias como a formação de ligações de hidrogênio podem estar envolvidas durante a reticulação do hidrogel.

Figura 17 – Reação de reticulação via base de Schiff entre a GAO e a NCEQ



4.3.1 Tempo de gelificação

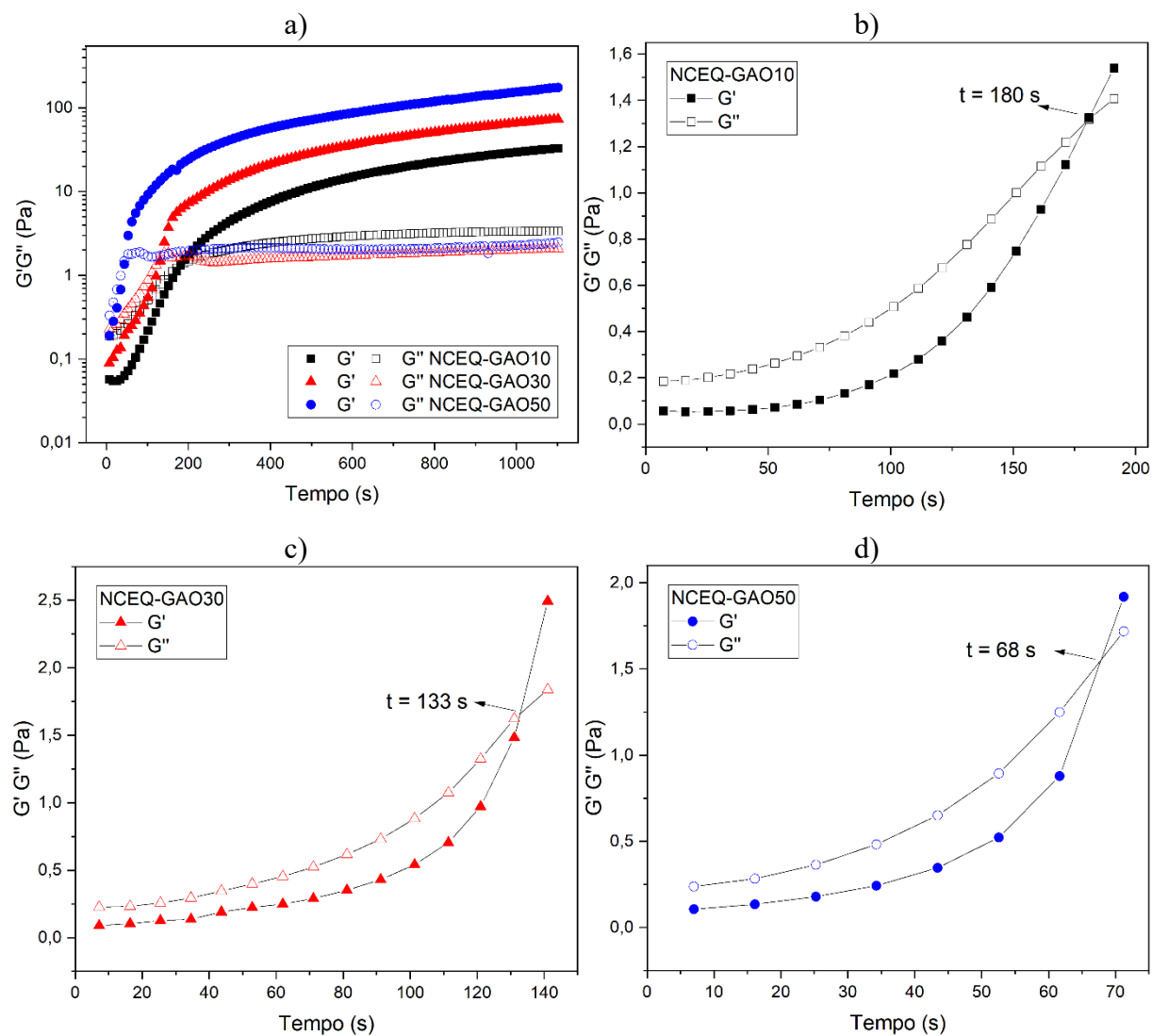
O tempo de gelificação (t_{gel}) é um importante parâmetro para hidrogéis injetáveis, pois indica o início da formação do gel. Uma reticulação muito rápida pode se tornar um problema, visto que o gel se forma antes mesmo da injeção. Já uma reticulação lenta pode levar a disseminação dos precursores para longe do local da injeção (LÜ *et al.*, 2015).

Diversos métodos podem ser utilizados para determinação do tempo de gelificação. Neste estudo foi utilizado o ensaio reológico.

Para o ensaio reológico as soluções dos precursores foram pipetadas diretamente no equipamento e o tempo foi medido a partir do ponto em que ambas entraram em contato até o momento em que o equipamento começou as medidas dos módulos de armazenamento (G') e perda (G''). O tempo foi de cerca de 30 segundos para todas as medidas. A Figura 18 exibe a evolução dos módulos com o tempo e o momento em que eles se cruzam (*crossover*). O t_{gel} para esse método é definido então como o tempo inicial do contato entre os precursores até o momento do *crossover*.

A Tabela 5 apresenta os valores de t_{gel} obtidos pelos ensaios reológicos.

Figura 18 – a) Evolução do módulo de armazenamento (G') e perda (G'') com o tempo para todos os hidrogéis a 37 °C, frequência de 1 Hz e tensão de cisalhamento 5 Pa. E regiões ampliadas com o tempo de cruzamento entre os módulos para b) NCEQ-GAO10, c) NCEQ-GAO30 e d) NCEQ-GAO50



Fonte: próprio autor

Tabela 5 – Tempos de gelificação por ensaios reológicos (geometria cone-placa, frequência de 1 Hz e tensão de cisalhamento 5 Pa e temperatura de 37 °C)

Hidrogel	Reologia - t_{gel} (seg)
NCEQ-GAO10	$208,8 \pm 3,6$
NCEQ-GAO30	$164,4 \pm 3,6$
NCEQ-GAO50	$100,8 \pm 2,4$

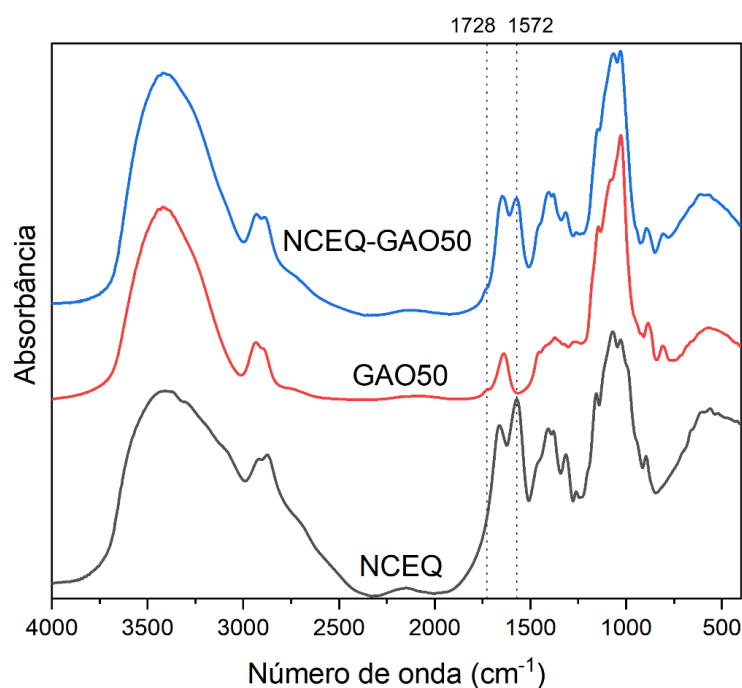
Fonte: próprio autor

Os tempos de gelificação se encontraram na faixa de 1 min e 41 segundos e 3 minutos e 29 segundos. É observado que quanto maior o grau de oxidação, mais rápido a reticulação ocorre. Isso se deve a maior concentração de grupos aldeído, levando assim a formação mais rápida da base de Schiff.

4.3.2 FTIR do hidrogel

A Figura 19 exibe o espectro dos precursores NCEQ, GAO50 e do hidrogel formados por ambos (NCEQ-GAO50).

Figura 19 – FTIR dos precursores NCEQ e GAO50 e do hidrogel NCEQ-GAO50 em pastilhas de KBr



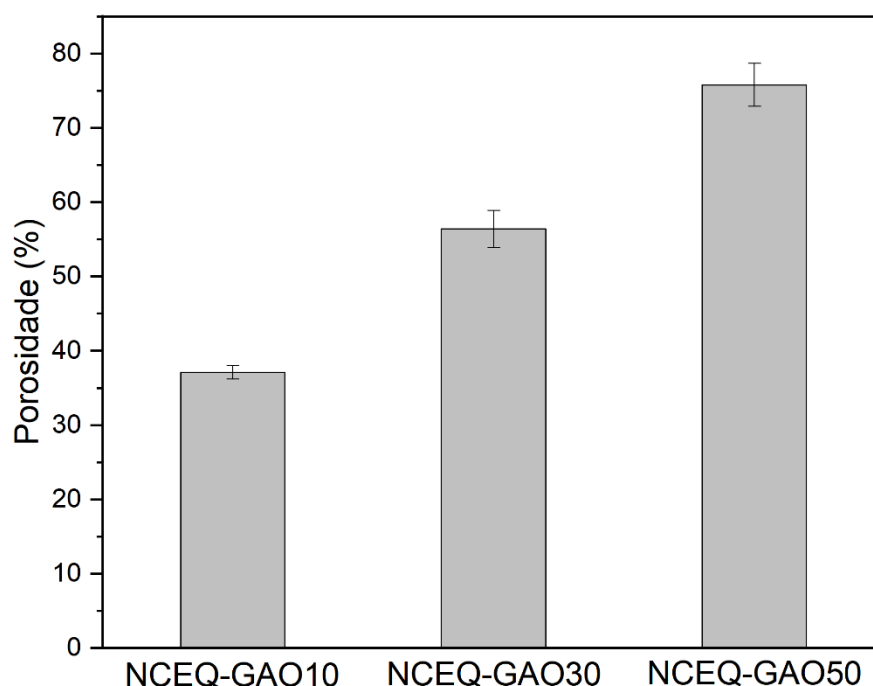
Fonte: próprio autor

É possível observar as bandas provenientes de ambos os precursores, como a banda larga com pico em 3419 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação O–H e o estiramento da ligação CH em 2931 cm^{-1} . A ligação imina ($\text{C}=\text{N}$) proveniente da reação da formação da base de Schiff apresenta uma banda característica em 1637 cm^{-1} , que não foi observada no espectro devido a sobreposição pela banda da amida em 1646 cm^{-1} . No entanto, a banda em 1728 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ da goma alfarroba oxidada, a banda relacionada aos hemiacetais em 885 cm^{-1} e a banda em 1572 cm^{-1} do estiramento N–H da NCEQ apresentaram diminuição de intensidade relativa, evidenciando assim a reticulação.

4.3.3 Porosidade

A porosidade é uma característica importante para hidrogéis aplicados na engenharia de tecidos, visto que está relacionada a possibilidade da entrada e das células e sua proliferação. A Figura 20 exibe os valores obtidos para a porosidade por infiltração de etanol através da Equação 5.

Figura 20 – Valores de porosidade (%) dos hidrogéis com diferentes graus de oxidação da GA no ensaio de imersão em etanol a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$



Fonte: próprio autor

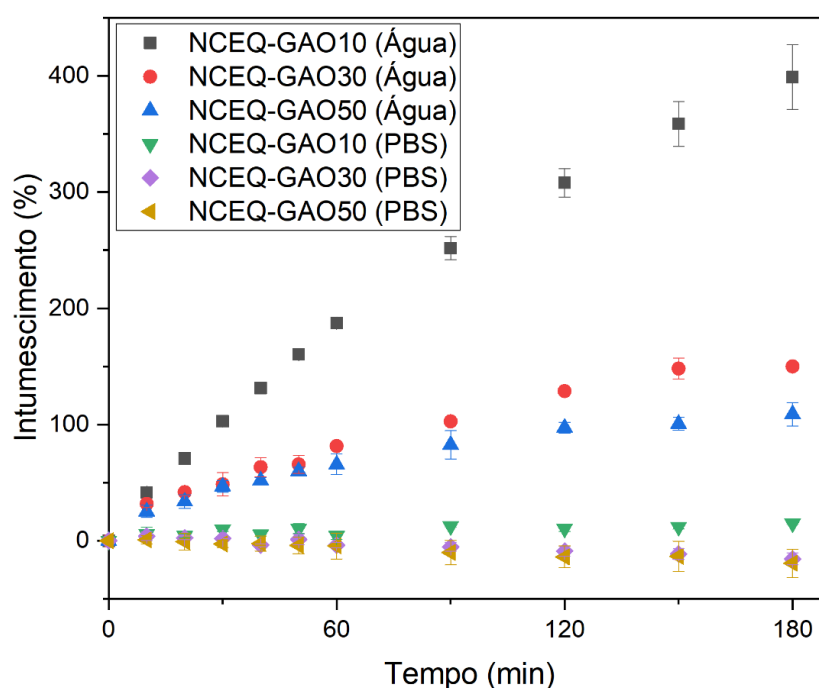
É possível observar que os géis apresentaram um maior valor de porosidade com um maior grau de oxidação: $37,1 \pm 0,9\%$ para o hidrogel NCEQ-GAO10, $56,4 \pm 2,6\%$ para NCEQ-GAO30 e $75,8 \pm 2,9\%$ para NCEQ-GAO50. Isso pode estar relacionado ao maior número de pontos de reticulação levando a uma estrutura tridimensional mais bem organizada.

4.3.4 Intumescimento

Outro importante parâmetro para hidrogéis injetáveis é o intumescimento, ou seja, a capacidade de absorver água, pois está diretamente relacionado à absorção de fluidos corporais, possibilitando o transporte de nutrientes e a proliferação celular (VALENTE *et al.*, 2013).

A Figura 21 exibe o intumescimento dos hidrogéis em água destilada e PBS durante um período de 3 horas.

Figura 21 – Intumescimento dos hidrogéis durante um período de 3 horas em água destilada e em PBS pH 7,4



Fonte: próprio autor

É possível observar um elevado intumescimento do hidrogel em água destilada. Após 3 horas o gel NCEQ-GAO10 apresentou um aumento de massa de 399%, 150% para NCEQ-GAO30 e 109% para NCEQ-GAO50. Quanto menor o grau de oxidação maior o

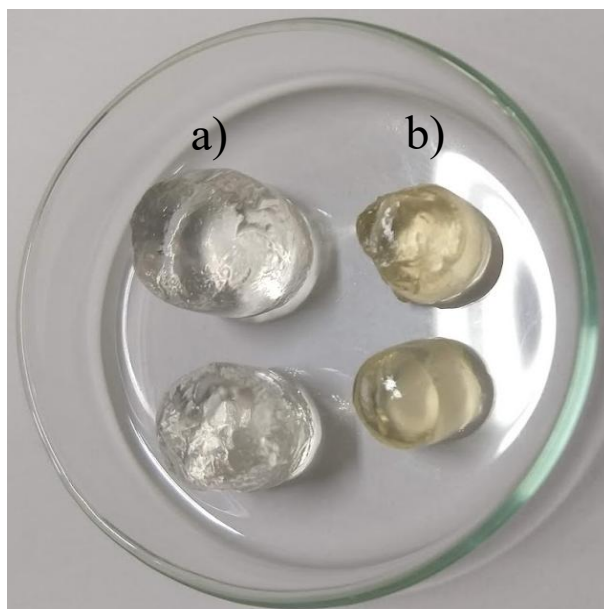
intumescimento. Isso pode ocorrer devido às quantidades reduzidas de pontos de reticulação, levando a possibilidade de uma maior expansão da estrutura dos géis para absorção de água.

Em PBS pH 7,4 o intumescimento é bem menor, após 3 horas a variação de massa foi de cerca de 10,2% para NCEQ-GAO10, -15,6% para NCEQ-GAO30 e -19,4% NCEQ-GAO50. O tampão fosfato-salino tem pH e salinidade similares ao sangue e fluidos corporais, assim um comportamento similar de intumescimento é esperado, levando a pequena variação de volume do hidrogel após a injeção, que é importante para a ocupação da lesão.

Os géis NCEQ-GAO30 e NCEQ-GAO50 tiveram uma variação negativa de massa no intumescimento em PBS. Isso pode ser explicado pela perda de água para o meio devido a diferença de concentração salina dentro e fora do hidrogel, a água migra para a solução utilizada no intumescimento.

A Figura 22 apresenta os géis NCEQ-GAO30 após as 3 horas de intumescimento em água e PBS, é possível observar que os hidrogéis em água tiveram um considerável aumento de volume, enquanto o volume do gel em PBS apresentou pequena variação (dados apresentados na Figura 21).

Figura 22 – Hidrogéis NCEQ-GAO30 após 3 horas de intumescimento em a) água e b) PBS

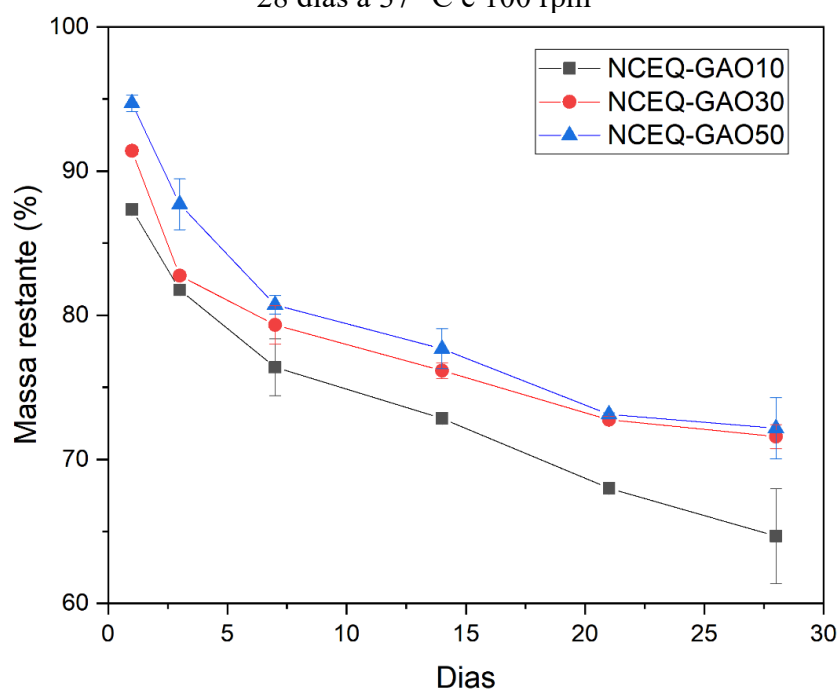


Fonte: próprio autor

4.3.5 Teste de degradação in vitro

A Figura 23 apresenta a degradação in vitro dos hidrogéis com diferentes graus de oxidação, durante um período de 28 dias.

Figura 23 – Massa restante após degradação *in vitro* dos hidrogéis em PBS pH = 7,4, durante 28 dias a 37 °C e 100 rpm



Fonte: próprio autor

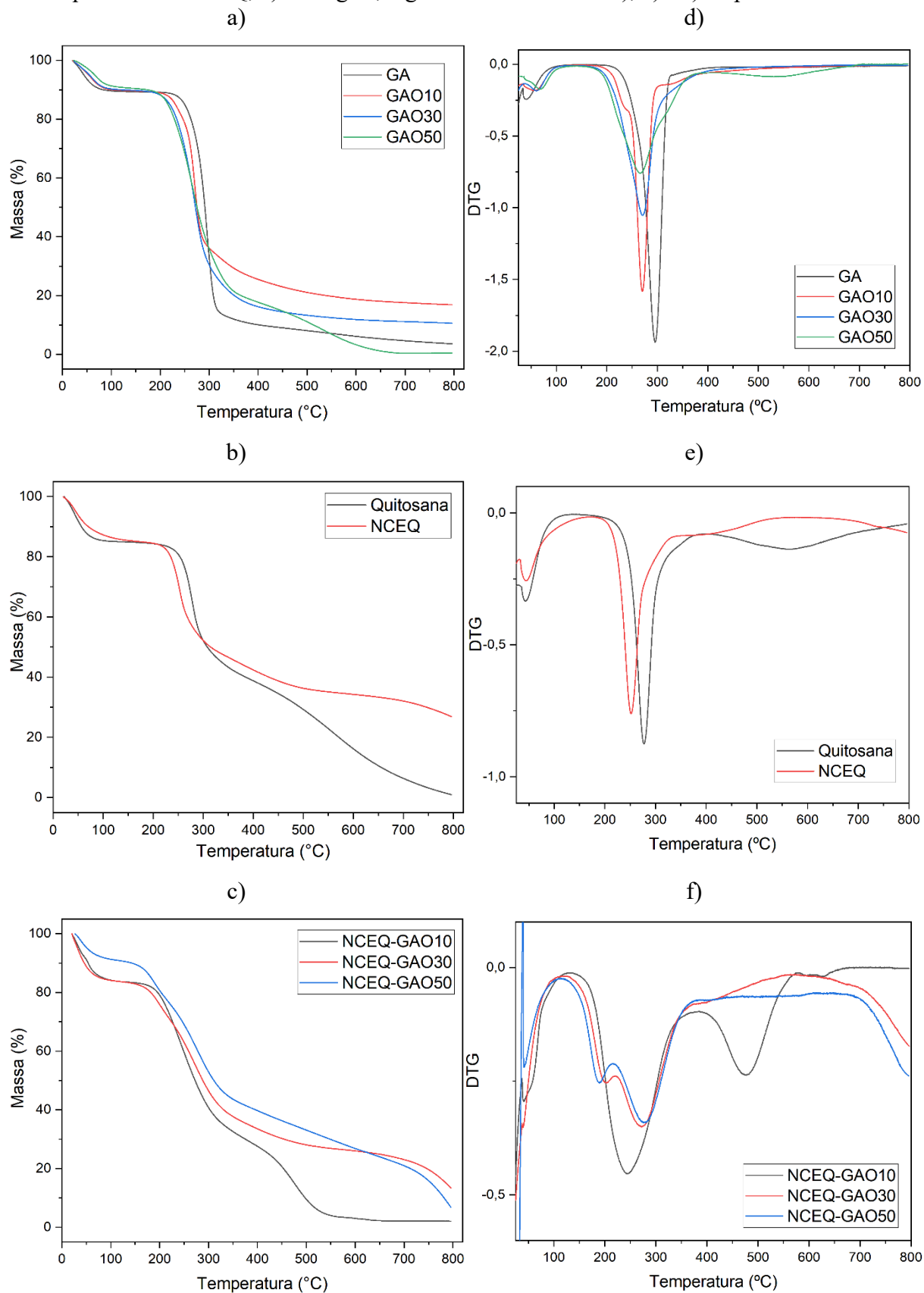
A degradação *in vitro* dos hidrogéis foi realizada em PBS (pH = 7,4), 37 °C e 100 rpm. Esses parâmetros foram utilizados para simular as condições encontrada no corpo humano após a inserção dos hidrogéis.

É observado que quanto menor o grau de oxidação da goma alfarroba maior é a perda de massa dos hidrogéis. Essa tendência é observada durante os 28 dias, e ocorre devido ao menor grau de reticulação com um menor grau de oxidação. Após 28 dias o hidrogel NCEQ-GAO10 teve a maior perda de massa (35,3%), enquanto os hidrogéis NCEQ-GAO30 e NCEQ-GAO50 perderam 28,4% e 27,8% em massa respectivamente. Os hidrogéis mantiveram suas estruturas tridimensionais após o período de degradação.

4.3.6 Análise termogravimétrica

Na Figura 24 estão apresentadas as curvas de TGA e DTG para a goma alfarroba, derivados oxidados, quitosana, NCEQ e hidrogéis. A Tabela 6 exibe as temperaturas dos eventos, a umidade e resíduo dos materiais.

Figura 24 – Curvas termogravimétricas para: a) goma alfarroba e derivados oxidados, b) quitosana e NCEQ, c) hidrogéis; e gráficos de DTG em d), e) e f) respectivamente



Fonte: próprio autor

Tabela 6 – Eventos térmicos observados nas curvas de TG e DTG para os hidrogéis e precursores

Amostra	T _{inicial} (°C)	Umidade (%)	T _{máxima} (°C)			Resíduo à 800 °C (%)
			I	II	III	
GA	175	10,8	40,1	295	-	3,6
GAO10	154	10,4	57,3	270	-	16,9
GAO30	141	10,2	60,9	271	-	10,6
GAO50	142	9,4	68,4	266	535	0,49
Quitosana	150	15,3	43,3	278	565	0,99
NCEQ	179	15,0	44,7	252	-	26,9
NCEQ-GAO10	135	16,7	41,0	244	476	2,0
NCEQ-GAO30	126	16,4	40,2	202	272	13,3
NCEQ-GAO50	121	9,2	41,7	189	277	6,8

Fonte: próprio autor

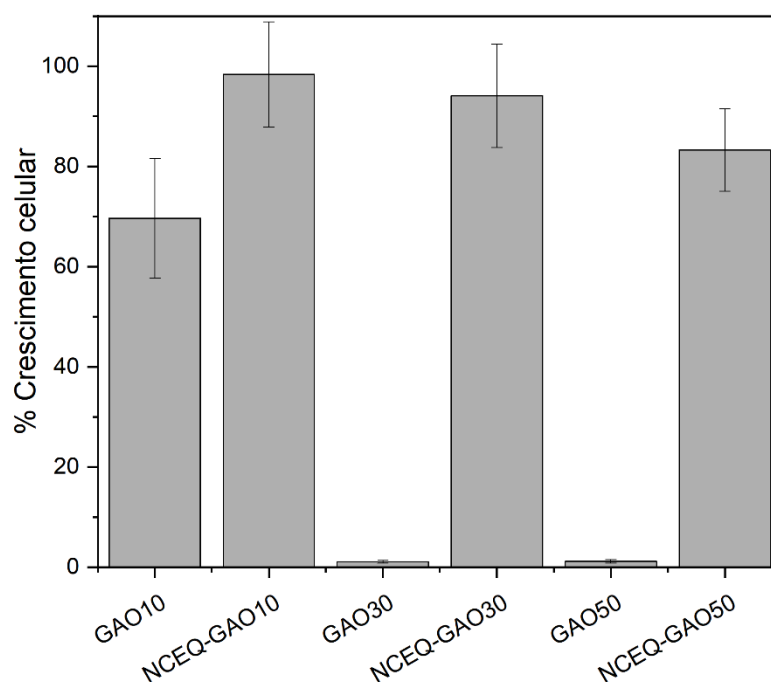
A curva termogravimétrica da goma alfarroba e dos derivados oxidados mostra uma perda de massa em duas etapas. A primeira consiste na perda de água absorvida e ligada, a segunda compreende a degradação do material em si. O teor de umidade é similar na GA e derivados. É observado que com um maior grau de oxidação se tem menores temperaturas iniciais de degradação, isso pode estar relacionado com a menor massa molar destes, e também com a abertura dos anéis monossacarídicos.

A quitosana, NCEQ e os hidrogéis também apresentam uma primeira etapa de perda de água, com uma ou duas etapas subsequentes relacionadas à degradação. Os resultados de análise térmica são importantes para verificar a estabilidade das amostras em aplicações que sejam necessárias a esterilização com temperatura até 100°C. Todos os precursores se mostraram estáveis.

4.3.7 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

A Figura 25 apresenta a porcentagem de crescimento celular *in vitro* dos hidrogéis e precursores oxidados. A porcentagem é calculada em relação ao grupo controle que é considerado 100%.

Figura 25 – Percentual da viabilidade celular em células de fibroblasto murino L929 após 72 horas de incubação com os hidrogéis e os polissacarídeos precursores, determinado pelo método do MTT



Fonte: próprio autor

É possível observar que a GAO10 possui uma viabilidade celular de 69,6%, enquanto GAO30 tem apenas 1,1% e GAO50 1,2%. Essa queda significativa está relacionada ao aumento da concentração de grupos aldeído livres em contato com as células. Aldeídos são eletrófilos, que podem formar ligações covalentes com sítios nucleofílicos em tecidos biológicos. Essa interação pode prejudicar as funções de enzimas, DNA, proteínas estruturais e outras macromoléculas, levando à inibição de processos celulares e eventual citotoxicidade (LOPACHIN e GAVIN, 2014).

Já todos os hidrogéis apresentaram alta viabilidade celular com 98,4% para NCEQ-GAO10, 94,1% para NCEQ-GAO30 e 83,3% para NCEQ-GAO50. Com a formação da base de Schiff na reticulação, a maior parte dos aldeídos presentes nas cadeias dos derivados oxidados estão ligados, inibindo assim a citotoxicidade.

5 CONCLUSÃO

A reação da goma alfarroba com diferentes quantidades do íon periodato deu origem a três derivados oxidados. A modificação destes foi confirmada por FTIR e RMN. Os valores de grau de oxidação experimentais foram próximos aos teóricos. A goma alfarroba oxidada tem menores massas molares com o aumento do grau de oxidação.

O derivado solúvel da quitosana foi obtido através da reação de adição de Michael com ácido acrílico, a modificação foi confirmada por FTIR.

A reticulação entre a N-carboxietil quitosana e derivados oxidados produziram hidrogéis com a coloração amarelada típica que é observada com a formação da base de Schiff.

Os tempos de reticulação, intumescimento e porosidade são influenciados pelo grau de oxidação da goma alfarroba.

Os hidrogéis não apresentaram variações significativas de volume nos ensaios de intumescimento em tampão PBS (pH = 7,4). Sendo assim adequados para preenchimento de lesões.

Os hidrogéis apresentaram alta viabilidade celular nos ensaios de citotoxicidade com células de fibroblasto murino L929, o que indica potencial para uso na preparação de suporte para crescimento celular.

As estruturas porosas produzidas possuem potencial aplicação na área dos biomateriais, por possuírem viabilidade celular e por suas propriedades serem moduláveis com os diferentes graus de oxidação.

REFERÊNCIAS

- ALIMENTARIA ADIN. Valência, Espanha, 2021. Disponível em: <https://www.adin.es/en/products/adingum/>. Acesso em: 5 maio 2021.
- BARAK, S.; MUDGIL, D. Locust bean gum: Processing, properties and food applications — A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 66, p. 74–80, 2014.
- BAKSHI, P. S.; SELVAKUMAR, D.; KADIRVELU, K.; KUMAR, N. S. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 1072–1083, 2020.
- BALAKRISHNAN, B.; JOSHI, N.; JAYAKRISHNAN, A.; BANERJEE, R. Selfcrosslinked oxidized alginate/gelatin hydrogel as injectable, adhesive biomimetic scaffolds for cartilage regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 8, p. 3650- 3663, 2014.
- BALAKRISHNAN, B.; SOMAN, D.; PAYANAM, U.; LAURENT, A.; LABARRE, D.; JAYAKRISHNAN, A. A Novel injectable tissue adhesive based on oxidized dextran and chitosan. **Acta Biomaterialia**, v. 53, p. 343-354, 2017.
- 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. 14-19, 1996.
- BRAZ, L.; GREHA, A.; CORVO, M. C.; LOURENÇO, J. P.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B.; ROSA DA COSTA, A. M. Synthesis and characterization of Locust Bean Gum derivatives and their application in the production of nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, p. 974–985, 2018.
- CHAKRAVORTY, A.; BARMAN, G.; MUKHERJEE, S.; SA, B. Effect of carboxymethylation on rheological and drug release characteristics of locust bean gum matrix tablets. **Carbohydrate Polymers**, v. 144, p. 50–58, 2016.
- DAKIA, P. A.; BLECKER, C.; ROBERT, C.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 5, p. 807–818, 2008.

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, n. 4, p. 2040–2048, 2005.

DIMATTEO, R.; DARLING, N. J.; SEGURA, T. In situ forming injectable hydrogels for drug delivery and wound repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 127, p. 167–184, 2018.

DUARTE, M. L.; FERREIRA, M. C.; MARVÃO, M. R.; ROCHA, J. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, n. 1–3, p. 1–8, 2002.

FERREIRA, C. R. N.; RAMOS, E. L. L.; ARAUJO, L. F. S.; SOUSA, L. M. S.; FEITOSA, J. P. A.; CUNHA, A. F.; OLIVEIRA, M. B.; MANO, J. F.; MACIEL, J. S. 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. 26–36, 2021.

FIGUEIRÓ, S. D.; GÓES, J. C.; MOREIRA, R. A.; SOMBRA, A. S. B. On the physicochemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan – collagen films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 3, p. 313–320, 2004.

GAO, X.; ZHOU, Y.; MA, G.; SHI, S.; YANG, D.; LU, F.; NIE, J. A water-soluble photocrosslinkable chitosan derivative prepared by Michael-addition reaction as a precursor for injectable hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 3, p. 507–512, 2010.

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

GUO, B.; ELGSAETER, A.; STOKKE, B. T. Gelation kinetics of scleraldehyde–chitosan co-gels. **Polymer Gels and Networks**, v. 6, n. 2, p. 113–135, 1998.

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

HUANG, J.; XIE, H.; YE, H.; XIE, T.; LIN, Y.; GONG, J.; JIANG, C.; WU, Y.; LIU, S.; CUI, Y.; MAO, J.; MEI, L. Effect of carboxyethylation degree on the adsorption capacity

of Cu(II) by N-(2-carboxyethyl)chitosan from squid pens. **Carbohydrate Polymers**, v. 138, p. 301–308, 2016.

JAYAKUMAR, R.; MENON, D.; MANZOOR, K.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 227–232, 2010.

JIANG, M.; WANG, K.; KENNEDY, J. F.; NIE, J.; YU, Q.; MA, G. Preparation and characterization of water-soluble chitosan derivative by Michael addition reaction. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 5, p. 696–699, 2010.

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

LIMA, E L. et al. 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, n. 1, 12 dez. 2019.

LOPACHIN, R. M.; GAVIN, T. Molecular Mechanisms of Aldehyde Toxicity: A Chemical Perspective. **Chemical Research in Toxicology**. [S. l.]: American Chemical Society (ACS), 2014.

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 & Interfaces**, v. 7, n. 23, p. 13029–13037, 2015.

MA, G.; YANG, D.; ZHOU, Y.; XIAO, M.; KENNEDY, J. F.; NIE, J. Preparation and characterization of water-soluble N-alkylated chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 1, p. 121–126, 2008.

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

MAIA, J.; FERREIRA, L.; CARVALHO, R.; RAMOS, M. A.; GIL, M. H. Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels. **Polymer**, v. 46, n. 23, p. 9604–9614, 2005.

- MELLATI, A.; AKHTARI, J. Injectable Hydrogels: A Review of Injectability Mechanisms and Biomedical Applications. **Research in Molecular Medicine**, v. 6, p. 1-19, 2019.
- MURALI, R.; THANIKAIVELAN, P. Bionic, porous, functionalized hybrid scaffolds with vascular endothelial growth factor promote rapid wound healing in Wistar albino rats. **RSC Advances**, v. 6, n. 23, p. 19252-19264, 2016.
- MUSCHIN, T.; YOSHIDA, T. Structural analysis of galactomannans by NMR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 1893–1898, 2012.
- 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, n. 8, p. 1918–1930, 2009.
- NEUKON, H. Carob bean gum: properties and applications. **Proceedings of the II international carob symposium**, Valência, Espanha, p. 551–555, 1988.
- NGUYEN, Q. V.; HUYNH, D. P.; PARK, J. H.; LEE, D. S. Injectable polymeric hydrogels for the delivery of therapeutic agents: A review. **European Polymer Journal**, v. 72, p. 602–619, 2015.
- PRAJAPATI, V. D.; JANI, G. K.; MORADIYA, N. G.; RANDERIA, N. P.; NAGAR, B. J. Locust bean gum: A versatile biopolymer. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 2, p. 814–821, 2013.
- RAMOS, E. L. L. **Preparo e caracterização de hidrogéis injetáveis de galactomanana de *Delonix regia* oxidada e gelatina**. Orientador: Judith Pessoa Andrade Feitosa. 2019. 78 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016. Disponível em: http://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/49209/3/2016_dis_ellramos.pdf. Acesso em: 2 set. 2021.
- SILVA, J. A. L.; GONÇALVES, M. P. Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol. **Food Hydrocolloids**, v. 4, n. 4, p. 277–287, 1990.
- SILVA, L. M.; ARAUJO, L. F. S.; ALVEZ, R. C.; ONO, L.; SÁ, D. A. T.; CUNHA, P. 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. 436–444, 2020.

SINGH, R. S.; KAUR, N.; RANA, V.; SINGLA, R. K.; KANG, N.; KAUR, G.; KAUR, H.; KENNEDY, J. F. Carbamoylethyl locust bean gum: Synthesis, characterization and evaluation of its film forming potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 348–358, 2020.

THAMBI, T.; PHAN, V. H. G.; LEE, D. S. Stimuli-Sensitive Injectable Hydrogels Based on Polysaccharides and Their Biomedical Applications. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 37, n. 23, p. 1881–1896, 2016.

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, n. 1, p. 5–15, 2013.

VLIERBERGHE, S. V.; DUBRUEL, P.; SCHACHT, E. Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 5, p. 1387–1408, 2011.

Web of Science. Disponível em: https://wcs-webofknowledge.ez11.periodicos.capes.gov.br/RA/analyze.do?product=WOS&SID=5DD8rzZlvMb8iXB5Igg&field=PY_PublicationYear_PublicationYear_en&yearSort=true
Acesso em: 20 de setembro de 2021.

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. 1018–1022, 2016.

YU, R. J.; BISHOP, C. T. Novel oxidations of methyl glycopyranosides by periodic acid in dimethyl sulfoxide. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 45, n. 19, p. 2195–2203, 1967.

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, n. 3, p. 400–402, 1991.