

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

BRUNO RAFAEL MACHADO

**HIDROGEL DE QUITOSANA E PECTINA APLICADOS PARA
LIBERAÇÃO CONTROLADA E MATRIZ SCAFFOLD**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

APUCARANA

2016

BRUNO RAFAEL MACHADO

**HIDROGEL DE QUITOSANA E PECTINA APLICADOS PARA
LIBERAÇÃO CONTROLADA E MATRIZ SCAFFOLD**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado ao curso Superior de Licenciatura em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Apucarana, como requisito parcial para obtenção do título de licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins

Co-orientador: Prof. Dr. Elton Guntendorfer Bonafé

APUCARANA

2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Apucarana
Orientador

Prof. Dr. Johnny Paulo Monteiro

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Apucarana
Membro

Prof. Dra. Patrícia Salomão Garcia

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Apucarana
Membro

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso de Licenciatura em Química”.

Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável de aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalhador permanecer.

(EINSTEIN, Albert)

AGRADECIMENTOS

Palavras transcritas em um papel não são suficientes para descrever a imensa gratidão que tenho por vocês que participaram desta jornada comigo, seja no decorrer dos dias, ou me transmitindo energias positivas para que eu tivesse a capacidade de chegar aqui.

Primeiramente, quero agradecer a Deus pelo dom do conhecimento que me forneceu, pelos dias bons e ruins que me proporcionaste, pelas barreiras impostas em minha vida para que eu pudesse crescer como pessoa. Senhor, obrigado por tudo que tens feito por mim até o presente momento, interceda por mim e pela jornada que terei pela frente. Amém!

Aos queridos e eternos professores ao qual tive o privilégio em receber os vossos conhecimentos. Obrigado por me ensinarem tão bem, por se preocuparem com meu aprendizado e por me incentivarem a sempre estudar para ter um futuro promissor.

Aos meus orientadores, ao qual sempre terão mesmo onde eu estiver, a minha admiração, respeito e carinho por tudo que me proporcionaram e por acreditarem sempre no meu potencial. “Pai” Elton e “Pai” Alessandro, professores incríveis, pessoas do bem, prestativas, sou eternamente grato a vocês e também a Deus por vos colocarem em meu caminho! Deus vos abençoe sempre!

Aos amigos, seja da faculdade, do voleibol, da vida, obrigado por estarem ao meu lado nos bons e maus momentos, amo cada um de vocês pelo incentivo, carinho e pelas boas risadas. Quero ter vossas amizades para todo sempre, Pri, Lucas, Rafael, Gustavo, David, Plínio, Renan, André, Fábio, Luli (macia), Ana Pedrozo, Jéssica, Larissa, Ana Paula, Bia Schulz, Susan, Fernanda, Ana Carla, Meiri, Ariel, Brayan, Renato (fera), Beatriz, Gabriel Kramel, Bruno Custódio.

Encerro estes agradecimentos, transcrevendo meu muito obrigado a minha família, a minha base, meu alicerce, minha vida. Todos os momentos sejam de alegria ou tristeza, vocês sempre estiveram ao meu lado, cobrando, elogiando, incentivando. Sou eternamente grato a Deus pela família que tenho. Amo cada um de vocês. Aproveito o gancho, para um agradecimento em especial ao meu pai (in

memorian). Pai, o senhor sempre será o meu exemplo, meu porto seguro, a minha inspiração. Você era uma prova viva de dedicação e de força, lutou todas as batalhas com um sorriso no rosto e um humor incrivelmente alegre. O senhor sempre se preocupou com meu bem estar e com os meus estudos. Obrigado por dar o real significado a palavra PAI. Sinto muito orgulho em ser seu filho! Eu te amo pra sempre! Saudade sem fim! Esta conquista é nossa!

RESUMO

MACHADO, Bruno Rafael. **Hidrogel de quitosana e pectina aplicados para liberação controlada e matriz scaffold**. 2016. 50 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2016.

Hidrogéis são formados a partir de materiais naturais ou sintéticos e possuem grande capacidade de absorção de água e fluidos corporais. Podem ser formados por polissacarídeos por meio de reticulações químicas ou físicas, permitindo aplicação em um grande espectro de áreas científicas. Quitosana (polissacarídeo catiônico) e pectina (polissacarídeo aniônico) podem ser associadas para promover a formação de um hidrogel com aplicação na área médica. Sendo assim, este trabalho visou à formação de um hidrogel da mistura destes dois polissacarídeos, com o objetivo de verificar sua biocompatibilidade, potencial para promover crescimento celular e, também, potencial para atuar como dispositivo para liberar o ácido gálico em diferentes condições de pHs. As análises indicaram que o hidrogel foi formado devido à existência de interações intermoleculares (especialmente interação via ligação de hidrogênio) entre as cadeias dos polissacarídeos. A superfície do hidrogel caracterizou-se como porosa ($364 \pm 122 \mu\text{m}$), possibilitando a aplicação do mesmo como matriz promotora de crescimento celular (células pré-osteoblastos MCT3-E1 de ratos), pois sua estrutura assemelhou-se a estrutura da matriz extracelular. Análise com células MCT3-E1 evidenciou que o hidrogel possui capacidade para proliferar o crescimento celular das células MCT3-E1 para até 125% de viabilidade celular em 10 dias de incubação, quando comparado ao controle negativo (100%). O hidrogel também apresentou excelente biocompatibilidade, especialmente sobre células saudáveis de macaco verde Africano (células VERO). No entanto, os estudos de liberação controlada de ácido gálico não foram satisfatórios, devido à elevada porosidade do material.

Palavras-chave: Hidrogel. Quitosana. Pectina. Cultura de Células. Liberação Controlada, Biocompatibilidade.

ABSTRACT

MACHADO, Bruno Rafael. Hydrogel chitosan/pectin applied in controlled release and scaffold matrices. 2016. 50 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Federal University of Technology. Apucarana, 2016.

Hydrogels are formed by natural or synthetic materials and they have high water-body fluids absorption capacities. Polysaccharides may be formed by means of chemical or physical cross-links, allowing application in a broad spectrum of scientific fields. Chitosan (a cationic polysaccharide) and pectin (an anionic polysaccharide) may be combined to promote formation of a hydrogel with application in the medical field. Thus, this work aimed the obtaintion of a hydrogel composed by both polysaccharides. In order it was assessed its biocompatibility, its potential to promote cell growth and also the its potential to act as a device to release gallic acid under different pH conditions. Analyses indicated that hydrogel is formed owing to intermolecular interactions (especially interaction via hydrogen bonding), between the polysaccharide chains. The surface of the hydrogel had large porous ($364 \pm 122 \mu\text{m}$), allowing its application as matrix support to promote cell growth of preosteoblasts MCT3-E1 cells on rats, since the extracellular matrix structure seems with the hydrogel structure. Analysis with MCT3-E1 cells showed that hydrogel had capacity to proliferate the growth of MCT3-E1 cells to 125% at 10 days of incubation, compared to negative control (100%). The hydrogel also showed excellent biocompatibility, especially on healthy cells of African green monkey (Vero cells). However, controlled release studies of gallic acid were not satisfactory, due to the high porosity of the material.

Keywords: Hydrogel. Chitosan. Pectin. Cell Culture. Controlled Release. Biocompatibility.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura química da quitosana (QT) **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2** – Estrutura química da pectina (PEC). **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3** – Hidrogel de QT/PEC após purificação..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4** – Precursores do hidrogel e provável estrutura do sistema QT/PEC. ... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5** – Espectros de FTIR da QT, PEC e hidrogel QT/PEC.30
- Figura 6** – Micrografia do hidrogel QT/PEC ampliada em 100x. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 7** – Difractogramas da QT, PEC e do hidrogel QT/PEC.....32
- Figura 8** – Cinéticas de liberação do ácido gálico (n =3).....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados de citotoxicidade sobre a célula VERO.	34
Tabela 2 - Resultados de citotoxicidade sobre a célula HT-29.	34
Tabela 3 - Resultados de viabilidade celular sobre as células MC3T3.	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CC50	Concentração citotóxica média
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
FTIR	Espectroscopia na região do Infravermelho
GD	Grau de desacetilação
MC3T3-E1	Células pré-osteoblastos de ratos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
PBS	Tampão fosfato salino
PEC	Pectina
QT	Quitosana
QT/PEC	Hidrogel de quitosana e pectina
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
VERO	Células saudáveis de rim obtidas de macaco verde africano
WAXS	Difração de Raio-X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 HIDROGÉIS	17
3.2 QUITOSANA	19
3.3 PECTINA	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 MATERIAIS	23
4.2 PREPARAÇÃO DO HIDROGEL DE QUITOSANA E PECTINA (QT/PEC).....	23
4.3 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE GELIFICAÇÃO.....	23
4.4 CARACTERIZAÇÃO	24
4.4.1 Espectroscopia Na Região Do Infravermelho (FTIR)	24
4.4.2 Difração de Raio-X (WAXS)	24
4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)	24
4.5 APLICAÇÕES.....	25
4.5.1 Ensaio de Citotoxicidade	25
4.5.2 Ensaio de Cultura de Células	25
4.5.3 Ensaio de Liberação Controlada	26
4.5.3.1 Curva de calibração e eficiência de encapsulação.....	26
4.5.3.2 Estudos de liberação controlada	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 ESTRUTURA DO HIDROGEL	28
5.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR)	30
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM).....	31
5.4 DIFRAÇÃO DE RAIO-X (WAXS)	32
5.6 CULTURA DE CÉLULAS.....	35
5.7 LIBERAÇÃO CONTROLADA	37
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Radicais livres são espécies químicas que contém elétrons desemparelhados em orbitais atômicos ou moleculares. São instáveis e por essa razão, quando em contato com alvos celulares, favorecem reações químicas que podem levar a morte de células (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). Os radicais livres são os principais responsáveis por inúmeras doenças que afetam o ser humano. Em grande parte dos casos, a natureza da espécie radicalar, amplificadora da lesão primária, é desconhecida, ocasionando um impasse no planejamento correto para utilização de fármacos detentores de propriedades antioxidantes que eliminem diretamente os radicais livres do corpo humano. Os antioxidantes atuam no organismo protegendo o sistema biológico contra efeitos dos radicais livres, pois estes causam processos ou reações oxidativas em macromoléculas ou estruturas celulares presentes no nosso organismo (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Os fármacos (antioxidantes) podem ser incorporados dentro de um transportador, que frequentemente é uma matriz polimérica. A matriz polimérica, na maioria das vezes funciona como agente protetor do fármaco encapsulado, suprimindo a ação do fluido gástrico sobre a molécula encapsulada, aumentando o tempo de vida do fármaco no organismo, e quando inserido na região de pH intestinal pode promover a liberação sustentada do mesmo. (SALAZAR, 2015). A liberação pode ser viabilizada por meio da variação de estímulos externos, tais como pH, temperatura, pressão osmótica, dentre outros (HORST, 2009).

Sendo assim, há necessidade de desenvolver um transportador eficaz para promover a proteção do antioxidante ácido gálico na região gastrointestinal de pH e, ao mesmo tempo, viabilizar sua liberação na região do cólon, local onde ocorre principalmente a absorção do fármaco na corrente sanguínea. Neste sentido, iremos propor um hidrogel à base de quitosana (QT) e pectina (PEC) pra promover a liberação sustentada do antioxidante ácido gálico. O ácido gálico será o fármaco modelo estudado.

Outro ramo de aplicação do hidrogel de QT/PEC aqui proposto envolve a área de crescimento celular (engenharia de tecidos), utilizando hidrogéis

biopoliméricos, devido suas características de baixa citotoxicidade, biodegradabilidade e excelente biocompatibilidade. Sua função consiste em atuar somente como um suporte passivo para a matriz celular não fornecendo qualquer bioatividade adicional (RIEGER; BIRCH; SCHIFFMAN (2013); VARGHESE; ELISSEFF (2006). Porém, hidrogéis adequados para promoverem crescimento celular devem ser porosos, com poros interconectados na matriz polimérica maiores que 300 µm. Um *scaffold* é uma matriz polimérica porosa com estrutura 3D, insolúvel em água e que possui grande capacidade para regenerar tecidos. *Scaffolds* em contato com células permite que a célula reconheça a matriz porosa 3D do hidrogel, favorecendo proliferação celular, devido principalmente a semelhança da estrutura porosa com a matriz extracelular das células.

Para obtenção de um *scaffold* poroso, o processo de liofilização das soluções utilizadas na preparação do hidrogel tem sido descrito como um método eficaz para produção de poros. No entanto, não é o único fator a ser considerado. (LIU, et al., 2016). O processo de gelificação do hidrogel, bem como as características físico-químicas dos componentes do sistema polimérico contribui também para a formação de poros interconectados.

Além disso, matrizes *scaffolds* devem atender alguns requisitos, para que sejam ideais para cultura de células, sendo: biocompatibilidade (QIAN, et al., 2013), biodegradabilidade e propriedades mecânicas apropriadas, dependendo de sua aplicação. Essas propriedades envolvem: alta relação superfície-volume, aderência da interface, e porosidade interconectada (RAO; STEGEMANN (2013); QIAN, et al., (2013); ROOHANI-ESFAHANI, et al., (2013). Desta forma, matrizes *scaffolds* 3D são excelentes materiais para cultura de células, proporcionando suporte de transição para : migração celular, ligação e proliferação de células (DU, et al., 2011; DU; YAREMA , 2010). Aqui, iremos propor o hidrogel de QT/PEC como um eficiente material *scaffold* para promover o crescimento celular de células pré-osteoblastos (tecido ósseo) de ratos (células MC3T3-E1). Estas células serão utilizadas como modelos, sendo realizados estudos de crescimento celular *in vitro*.

Com isso, os objetivos deste trabalho consistiram em preparar um hidrogel de QT/PEC e caracterizá-lo. Ainda foram realizados estudos de liberação controlada do antioxidante ácido gálico em diferentes condições de pHs, utilizando o hidrogel como agente carreador do fármaco e, ainda avaliou-se o potencial do

hidrogel polimérico a base de QT/PEC para atuar como matriz *scaffold* sobre as células MC3T3-E1. Todos os estudos foram avaliados na forma *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter o hidrogel de QT/PEC, caracterizá-lo quanto a estrutura química e estudar algumas propriedades, tais como: potencial para desenvolver proliferação celular de células pré-osteoblastos (células MC3T3-E1 de ratos), estudar a biocompatibilidade do hidrogel e avaliar o potencial do mesmo para promover a liberação controlada do antioxidante ácido gálico variando condições de pHs.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o hidrogel de quitosana e pectina;
- Caracterizar o hidrogel por meio das técnicas de difração de raios-x (WAXS), microscopia eletrônica de varredura (SEM) e espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).
- Avaliar a citotoxicidade do hidrogel sobre células VERO saudáveis e células cancerígenas epiteliais do colón (células HT-29);
- Avaliar se o hidrogel atua como matriz para liberar o ácido gálico de forma sustentada em diferentes condições de pH.
- Avaliar o potencial do hidrogel para atuar como matriz *scaffold* sobre as células MC3T3-E1.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 HIDROGÉIS

A palavra hidrogel refere-se aos géis (naturais ou sintéticos) que possuem a capacidade de absorver e manter quantidades significativas de água ou fluidos corporais em suas estruturas (GANJI; ABDEKHODAIE; RAMAZANY, 2007; GANJI; ABDEKHODAIE, 2008). Possuem estrutura tridimensional e hidrofílica, de alto peso molecular (REDDY, et al., 2014), sendo formados por homopolímeros ou copolímeros, de caráter insolúvel, devido às reticulações químicas existentes. A reticulação (entrelaçamento das cadeias poliméricas no hidrogel) pode ocorrer via ligações de compartilhamento de pares de elétrons, produzindo géis não reversíveis ou reticulação física formada por meio de interações secundárias e/ou interação eletrostática, que produz às vezes géis reversíveis (KATIME; KATIME; KATIME, 2004).

Os hidrogéis formados por reticulações químicas são denominados como hidrogéis químicos ou permanentes, pois seu conjunto estrutural não pode ser dissolvido. Os hidrogéis obtidos por reticulação física (obtidos via interação eletrostática e/ou interações secundárias tipo Van der Waals, ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo e íon-dipolo são denominados de hidrogéis reversíveis, e sua estrutura pode ser dissolvida, variando estímulos externos (pH, força iônica e temperatura) (AOUADA, 2009). No entanto, os hidrogéis físicos podem também ser irreversíveis/permanentes. Isso ocorre quando a interação entre os componentes do sistema ocorre de forma efetiva.

As cadeias reticuladas dos polímeros no hidrogel são geralmente compatíveis termodinamicamente com fluidos aquosos, permitindo o intumescimento do material (AHMED, 2015). O intumescimento ocorre devido à presença de grupos funcionais presentes na estrutura dos polissacarídeos componentes do sistema, tais como -OH, -COOH, -CONH₂, -NH₂, -SO₃H (ADRIANO et al., 2008; MENDES et al., 2010). A insolubilidade é influenciada pelo grau de entrelaçamento (grau de reticulação) das cadeias poliméricas no hidrogel e pelas condições de pH, temperatura e força iônica do meio.

Mesmo com sua elevada afinidade pela água, os hidrogéis são impedidos de se dissolverem neste meio devido as ligações químicas ou físicas presentes entre as cadeias poliméricas. Assim, a água penetra entre as redes poliméricas, causando inchaço, proporcionando ao hidrogel adquirir sua forma (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008; HENNINK; VAN NOSTRUM, 2002).

Ao entrar em contato com um meio de intumescimento, os hidrogéis interagem com este meio, devido a fatores físicos intrínsecos a rede 3D e a fatores externos (RUDZKINSKI et al., 2002). Isso proporciona a ampliação da estrutura do hidrogel, aumentando o distanciamento entre as ligações das cadeias poliméricas e o seu respectivo volume. Desta forma, ao manter o controle dos fatores físicos e externos (quantidade e tipo de agente de reticulação, balanço hidrofílico-hidrofóbico, densidade das estruturas poliméricas, grupos hidrofílicos) o hidrogel pode ser aplicado, possibilitando a formação de matrizes com propriedades mecânicas adequadas (MATTOSO et al., 2009).

Pelo fato de suas similaridades aos tecidos vivos naturais, os hidrogéis são utilizados na produção de membranas de biossensores, lentes de contato, revestimento para coração artificial, dispositivo para liberação de fármacos, material para pele artificial, agricultura, aditivos alimentares, curativo para feridas, produtos de higiene dispositivos para viabilizar cultura de células, dentre outras aplicações (PEPPAS et al., 2000; ANISHA, et al., 2010; CHEN, et al., 1995; VAN DER LINDEN, et al., 2003).

A formação de hidrogéis ocorre a partir de materiais naturais, sintéticos ou a partir da junção de ambos. Quando sua produção ocorre a partir de polímeros naturais, sua propriedade mecânica pode ser irregular. Entretanto, a biodegradabilidade, a biocompatibilidade e o reconhecimento de moléculas biológicas são propriedades vantajosas que hidrogéis possuem pelo emprego de polissacarídeos naturais como agentes precursores (LIN; METTERS, 2007). Assim, os polissacarídeos são excelentes candidatos ao preparo de hidrogéis biocompatíveis, uma vez que, possuem diversidade de grupos funcionais em sua respectiva estrutura, que respondem a diferentes estímulos de acordo com o meio em que estão inseridos (LOPES, et al., 2017).

Dentre os polissacarídeos utilizados para preparar hidrogéis, a QT é sem dúvida um dos mais utilizados, bem como, o alginato, gelatina, sulfato de condroitina, colágeno, derivados de celulose, amido, PEC, heparina, gomas, ácido

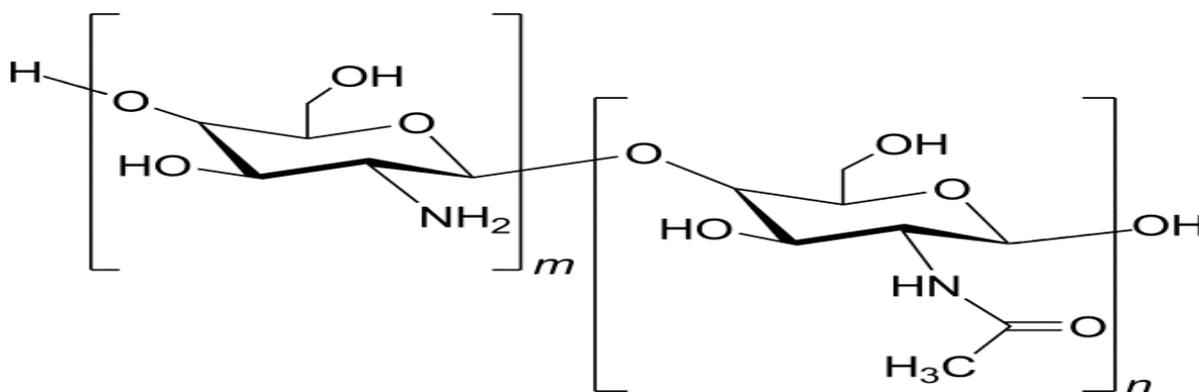
hialurônico, carragena, dextrina, entre outros (ADRIANO et al., 2008; MENDES et al., 2011). A partir das propriedades conhecidas na literatura acerca da QT e PEC, os tópicos a seguir destacam algumas aplicações e benefícios destes polissacarídeos.

3.2 QUITOSANA

Caracterizado como heteropolissacarídeo pseudonatural a QT é proveniente natural das paredes celulares e esporos das espécies fúngicas (*Mucor* e *Zygomycetes*) (KUBOTA et al., 2000) ou por meio da reação de N-desacetilação da quitina (ALVES; MANO, 2008), sendo o principal composto sobre exoesqueletos dos artrópodes (RABEA, et al., 2003), como caranguejos, lagostas, siris (KRAJEWSKA, 2004).

Quimicamente a QT é um polissacarídeo catiônico (YOSHIDA; BASTOS; FRANCO, 2010; RECILLAS, et al., 2011) com uma estrutura química copolimérica formada por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) e 2-acetamido-2desoxi-D-glicopiranosose (GlcNac), interligadas por meio de ligações glicosídicas do tipo $\beta(1 \rightarrow 4)$. Entretanto, há predominância da unidade de glicosamina (GlcN) (ALVES; MANO, 2008). A Figura 1 representa a estrutura repetitiva da QT.

Figura 1 - Estrutura química da quitosana (QT)
Fonte: Autoria própria



Para obter a QT através da reação de N-desacetilação da quitina, os grupos acetamido (-NHCOCH₃) pertencentes a N-acetilglicosamina (GI-NAC) são substituídos por grupo funcional amino (-NH₂), formando desta forma o polissacarídeo almejado em diferentes graus de substituição. No entanto, este

produto obtido somente passa a ser denominado de QT quando o grau de desacetilação (GD) está acima ou igual a 60%, ou seja, este valor representa a capacidade do biopolímero se tornar solúvel em soluções ácidas diluídas (ROBERTS, 1992).

Dentre as propriedades da QT, o GD é a propriedade química mais importante, por ser influenciador das características químicas, físicas e biológicas do biopolímero (JIANG; CHEN; ZHONG, 2003). A proporção deste parâmetro na estrutura da QT está relacionada às condições de síntese utilizadas na desacetilação, bem como a fonte de extração da quitina (SPIN-NETO et al., 2008; JIANG; CHEN; ZHONG, 2003). Identificada pela primeira vez em 1884, a QT possui diversas características, como por exemplo: basicidade, biodegradabilidade (enzimas quitinases clivam as ligações glicosídicas), agente de cura e regeneração de tecidos, capacidade bacteriostática e não-toxicidade (DRESSLER, 2008).

Devido à grande vantagem proporcionada pela utilização de polímeros obtidos a partir de fontes renováveis, a QT tem sido um dos biopolímeros mais atraentes para a agricultura, medicina, indústria de alimentos, meio ambiente, indústria de cosméticos, indústria farmacêutica, e no tratamento de águas residuais. A QT pode ser aplicada na forma de filmes, hidrogéis processados nas formas de micro e nanopartículas, membranas, esferas, dentre outros dispositivos (LAVORGNA, et al., 2014; WICKER, et al., 2014).

Hidrogéis contendo QT podem ser produzidos por dois métodos: reticulação iônica (via associação física), por coordenação com íons metálicos e outros polieletrólitos aniônicos, e por reticulação química/irreversível entre a QT e um agente de reticulação (DASH, et al., 2011; XU et al., 2013; YANG, et al., 2012). Hidrogéis fabricados por reticulação iônica possuem melhor biocompatibilidade em comparação aos hidrogéis preparados por meio de agentes de reticulação, que muitas vezes são sintéticos e tóxicos. Neste caso, as aminas primárias da QT ($pK_a = 6,3$) possuem condições de serem protonadas em meio cujo pH é menor que 6,3 tornando o polissacarídeo solúvel (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010).

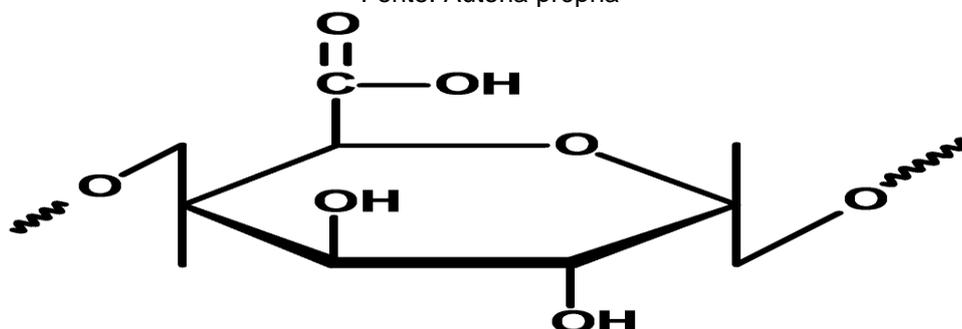
Sua aplicação na forma de hidrogel é decorrente de suas características de baixa citotoxicidade, renomada atividade bactericida, biodegradabilidade e biocompatibilidade com outros polímeros (KONG, et al., 2010), e pode promover adesão, proliferação e diferenciação celular (KHOR; LIM, 2003; WEI et al., 2010), permitindo que sejam aplicados na cultura de células, atuando como matriz *scaffold*

(JAYAKUMAR, et al., 2010). Além disso, os grupos quelantes (grupos hidroxila e grupos amino) fazem com que este polissacarídeo também seja aplicável como um adsorvente eficiente na remoção de vários tipos de poluentes em efluentes (UNAGOLLA; ADIKARY; 2015).

3.3 PECTINA

A pectina (PEC) é um biopolímero complexo, de baixa citotoxicidade e encontrado como um componente da lamela média em diversas plantas (COSTA; FERREIRA; CRUZ, 2016). Quimicamente é um polissacarídeo aniônico, em que sua estrutura é formada por uma cadeia linear de ácido α -(1,4)-D-galacturônico, sendo os grupos carboxílicos parcialmente metoxilados (Figura 2) (BOURGEOIS et al., 2006; NINAN et al., 2013). Por possuir uma estrutura complexa seu peso molecular encontra-se entre 50.000 a 180.000 Da. (SINHA; KUMRIA, 2001).

Figura 2– Estrutura química da pectina (PEC).
Fonte: Autoria própria



A PEC é encontrada em plantas superiores, tais como macieiras, laranjeiras e pereiras, estando localizada especificamente na parede celular primária das células vegetais e, também, nas camadas intercelulares, proporcionando adesividade na união entre as células, como também, firmeza e resistência mecânica (BRANDÃO; ANDRADE, 1999; MESBAHI; JAMALIAN; FARAHNAKY, 2005; NINAN, et al. 2013). A PEC também é importante para a firmeza dos vegetais, característica fundamental para o crescimento, amadurecimento, armazenamento e processamento dos mesmos. De forma natural, a PEC está vinculada à celulose, a hemicelulose e a lignina, estando presente na forma de protopectina, sendo extraída do mesocarpo (polpa) de algumas frutas cítricas (PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009).

A PEC é dividida em alguns grupos, mediante o seu grau de esterificação, sendo agrupadas em: PEC de alto grau de metoxilação, com valores na faixa de 60 a 75%, PEC com baixo grau de metoxilação com valores na faixa de 20 a 40%. Também há outros compostos pécicos como a PEC amidadas (VANDAMME et al., 2002).

A variação do grau de metoxilação influencia na capacidade de formação de géis da PEC, pois materiais com grau de metoxilação elevado necessitam de um pH próximo a 3 para que ocorra formação de gel, sendo solúveis em água em temperaturas superior a 60 °C, e necessitando às vezes de um agente dispersante para que não ocorra a formação de grumos durante o processo de gelificação. As PEC com grau de metoxilação baixo, produzem gel independente do pH da solução, na presença de íons cálcio ou outros cátions divalentes (SRIAMORNSAK, 2003; CHO; HWANG, 2000; GANCZ; CORREDIG; ALEXANDER, 2006).

As características e propriedades da PEC permitem que este polissacarídeo seja aplicável em inúmeras áreas, tais como, tecnologia e processamento de alimentos, conferindo firmeza, retenção de sabor e aroma, como também sendo empregada na dispersão e estabilidade de emulsões (GANCZ; ALEXANDER; CORREDIG, 2006).

Outras duas áreas importantes de aplicação da PEC remetem-se a área farmacêutica e a cultura de células. Na área farmacêutica este composto encontra-se inscrito na FDA (Food and Drug Administration) como um aditivo seguro, sem a imposição de limites para sua ingestão diária (CRISPÍN; CARO; VEIGA, 2012). Neste ramo, este polissacarídeo é utilizado na produção de medicamentos antidiarreicos, desintoxicantes, na área de engenharia de tecidos, na proteção gastrointestinal (LIU, et al., 2003; SUNGTHONGJEEN, 2004) e na área de liberação controlada de fármacos (SUNGTHONGJEEN, 1999). A aplicação da PEC em hidrogéis permite que este polissacarídeo atue como um material propício para cultura de células, atuando como matriz scaffold. Isto se deve principalmente as propriedades deste polissacarídeo como, biocompatibilidade e capacidade de imobilização de células (AMIRIAN, et al., 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Pectina de maçã (PEC) com $M_w = 2,9 \times 10^5 \text{ g/mol}^{-1}$ contendo unidades de ácido galacturônico 74% e ácido gálico (99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). A quitosana (QT) (85% desacetilada) com massa molar = $8,7 \times 10^4 \text{ g/mol}^{-1}$ foi adquirida da Golden-Shell Bioquímica (China). Outros reagentes, tais como hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) foram utilizados, sem qualquer purificação adicional.

4.2 PREPARAÇÃO DO HIDROGEL DE QUITOSANA E PECTINA (QT/PEC)

Foram preparadas separadamente soluções dos polissacarídeos (QT e PEC) sob agitação magnética (30 min) a 65 °C em solução 0,1 mol.L⁻¹ de HCl. Após obtenção das soluções isoladas, estas foram misturadas, utilizando a composição 10 mL da solução de QT (1,0% m/v) com 30 mL da solução de PEC (1,0% m/v). Após 1 h, o sistema (40 mL) foi mantido sob temperatura ambiente (25 °C) até se atingir a gelificação. Após, o hidrogel foi purificado por imersão em água destilada durante 72 h, ajustando o pH do sobrenadante (pH = 7,0) com uma solução 0,1 mol.L⁻¹ de NaOH. Após a lavagem, o hidrogel manteve uma estrutura intacta. O hidrogel intumescido e neutralizado foi cortado em pequenos pedaços com formato desejado, congelado e liofilizado a -50 °C, durante 72 h. Esta amostra foi então esterilizada e subsequentemente utilizada em ensaios de culturas de células, ensaios de citotoxicidade e estudos de liberação.

4.3 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE GELIFICAÇÃO

A determinação da temperatura de gelificação foi realizada por meio método de inclinação, ao qual um tubo de ensaio contendo a solução a quente do hidrogel (65 °C) é inclinada, sendo a mesma depositada dentro de um banho-maria termostaticado, monitorando sua temperatura com auxílio de um termômetro. A

temperatura em que a solução deixa de fluir é definida como a temperatura de gelificação. Esta respectiva análise foi realizada em triplicata ($n = 3$).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROGEL

4.4.1 Espectroscopia Na Região Do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram registrados utilizando um espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (Modelo Cary 630), operando a partir de 650 a 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} , obtido após acumular 64 scans.

4.4.2 Difração de Raio-X (WAXS)

Perfis de WAXS foram registrados em um difratômetro modelo Shimadzu XRD-600 equipado com radiação Cu K-Ni-filtrada. Os perfis de WAXS foram coletados na faixa de espalhamento $2\theta = 5-70^\circ$, com resolução de $0,02^\circ$ até 2°min^{-1} de velocidade de varredura. As análises foram realizadas por aplicação de uma voltagem de aceleração de 40kV e uma corrente de intensidade de 30 mA.

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A morfologia do hidrogel foi investigada por análise de SEM usando um equipamento Shimadzu, modelo SS 550. A amostra foi revestida por uma fina camada de ouro para permitir a visualização das imagens de SEM. As imagens foram obtidas através da aplicação de um feixe de elétrons acelerados com voltagem de 10-15 kV. Os diâmetros médios dos poros foram calculados pela análise de imagens de SEM, usando o software Size Meter©, versão 1.1.

4.5 APLICAÇÕES

4.5.1 Ensaio de Citotoxicidade

A atividade citotóxica do hidrogel foi avaliada contra células HT-29 (células epiteliais tumorais do cólon humano) e células VERO (células epiteliais do rim de Macaco Verde Africano) por meio do ensaio MTT. Este ensaio colorimétrico baseia-se na capacidade das mitocôndrias viáveis de converter MTT (sal de tetrazólio amarelo [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-brometo) em cristais de púrpuras de formazan. Para isso, células VERO e HT-29 cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino foram dispensadas em placa estéril de 24 poços na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL e incubadas por 24 h a 37 °C e 5% de tensão de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados o hidrogel. Após 48 h de incubação, as células foram lavadas com PBS e MTT (2 mg/mL) foi adicionado em cada poço e incubados na ausência de luz, a 25 °C. Após 4 h, foi adicionado DMSO (dimetil sulfóxido), a fim de romper as células e solubilizar os cristais de púrpuras de formazan, e a absorbância foi lida em espectrofotômetro (BIO-TEK Power Wave XS spectrophotometer) a 570 nm. O valor de CC₅₀ (concentração citotóxica de 50%) foi estimada em relação ao controle positivo (FACCHI, et al., 2016).

4.5.2 Ensaio de Cultura de Células

Para a avaliação da viabilidade celular do hidrogel, foi utilizado novamente o ensaio MTT. Para isso, células de pré-osteoblastos (células MC3T3-E1) foram cultivadas em meio α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina/estreptomicina e mantidas a 37 °C e 5% CO₂. Após atingirem 90% de confluência, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspensas em α -MEM. Após, as células foram plaqueadas sobre as amostras teste em placas de 24 poços ou somente sobre a placa (controle negativo), com uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células por poço e incubadas por 2, 5 e 10 dias a 37 °C e 5% de CO₂. A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT (sal de tetrazólio amarelo [3-

(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-brometo). Após 2, 5 e 10 dias de incubação, as células foram lavadas com PBS e MTT (2 mg/mL) foi adicionado em cada poço e incubados na ausência de luz, a 25 °C. Após 4 h, foi adicionado DMSO (dimetil sulfóxido), a fim de romper as células e solubilizar os cristais de púrpuras de formazan, e a absorbância foi lida em espectrofotômetro (BIO-TEK Power WaveXS spectrophotometer) a 570 nm. A viabilidade celular foi estimada em relação ao controle negativo (células plaqueadas sem o hidrogel) (FACCHI, et al., 2016).

4.5.3 Ensaio De Liberação Controlada

4.5.3.1 Curva de calibração e eficiência de encapsulação

O método envolvendo a captura do radical livre DPPH• (2,2-Difenil-1-picrilidrazil) utilizada para quantificar o ácido gálico nos estudos de liberação controlada foi realizado de acordo com BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, (1995), com algumas modificações (MA et al., 2011). O método em questão será utilizado para quantificar a eficiência de encapsulação do ácido gálico na matriz do hidrogel, bem como, avaliar a cinética de liberação do fármaco proposto.

Para a construção da curva de calibração, alíquotas de 25 µL da solução padrão do ácido gálico com concentração de 2.500 µmol.L⁻¹ foram misturadas em água e, em seguida, com 2,00 mL de uma solução metanólica de DPPH• na concentração de 6,25x10⁻⁵ mol L⁻¹. A mistura foi deixada no escuro por 30 min e, em seguida, a absorbância foi medida em 517 nm, utilizando um espectrofotômetro Cary 60. Soluções de ácido gálico em diferentes concentrações foram utilizadas para construção da curva de calibração, sendo a capacidade antioxidante expressa em µmol de equivalente ácido gálico g⁻¹ de amostra ácido gálico.

Para incorporar o ácido gálico na amostra, 1,0 g do hidrogel seco foi imerso em uma solução de 50 mmol L⁻¹ de ácido gálico durante 24 h, sendo evitado o contato do sistema com a luz. Após este tempo a quantidade de ácido gálico presente no sobrenadante, assim como, a eficiência de encapsulação foram estimadas por meio do método DPPH•, utilizando a curva de calibração citada anteriormente.

4.5.3.2 Estudos de liberação controlada

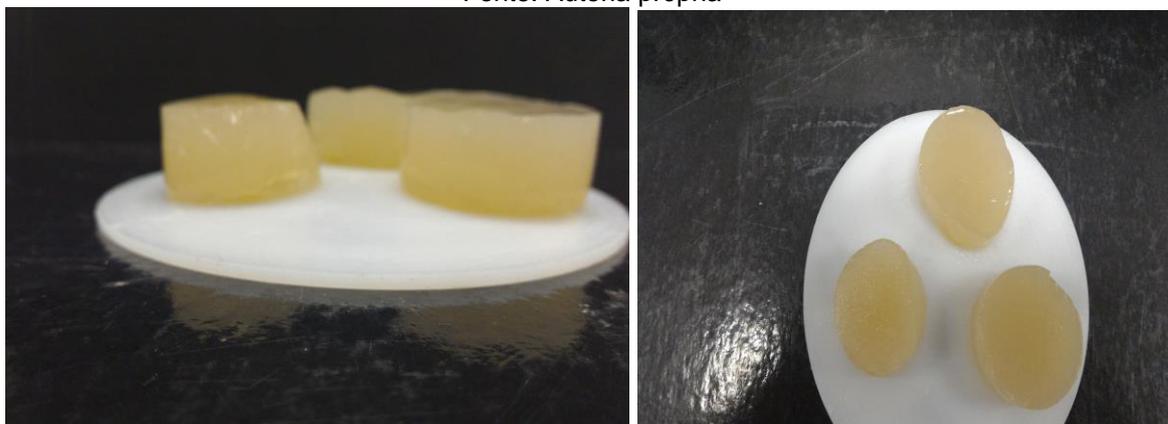
0,01 g do hidrogel encapsulado com ácido gálico foi colocado em 25 mL de soluções aquosas de HCl/KCl (pH 1,2) e $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH (6,8) a 37°C. Foram coletadas alíquotas de 30 μL do sobrenadante em função do tempo e estas foram adicionadas em 3,0 mL da solução de DPPH•. Após 30 min a absorvância em 517 nm foi estimada. A liberação do antioxidante incorporado no hidrogel foi avaliada pelo método DPPH•, descrito anteriormente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTRUTURA DO HIDROGEL

A QT solubiliza-se em meio ácido, devido à protonação dos grupos amino em sua estrutura. Portanto em meio HCl 0,1 mol/L a QT apresenta em sua estrutura os grupos amino na forma NH_3^+ , pois o pKa dos grupos $-\text{NH}_2$ é em torno de 6,3 (XU; HAN; LIN, 2016). A PEC solubiliza-se em HCl 0,1 mol/L, entretanto, necessita de aquecimento para rompimento das interações PEC-PEC, ocasionando a protonação dos grupos $-\text{COOH}$ de sua estrutura, diminuindo sua interação com a H_2O , pois o pKa dos grupos $-\text{COOH}$ é em torno de 3,5. Deste modo em meio de HCl 0,1 mol/L os polissacarídeos não interagem via interação de Coulomb. Após purificação, o hidrogel de QT/PEC apresentou aspecto homogêneo, de coloração clara (Figura 3).

Figura 3 – Hidrogel de QT/PEC após purificação.
Fonte: Autoria própria



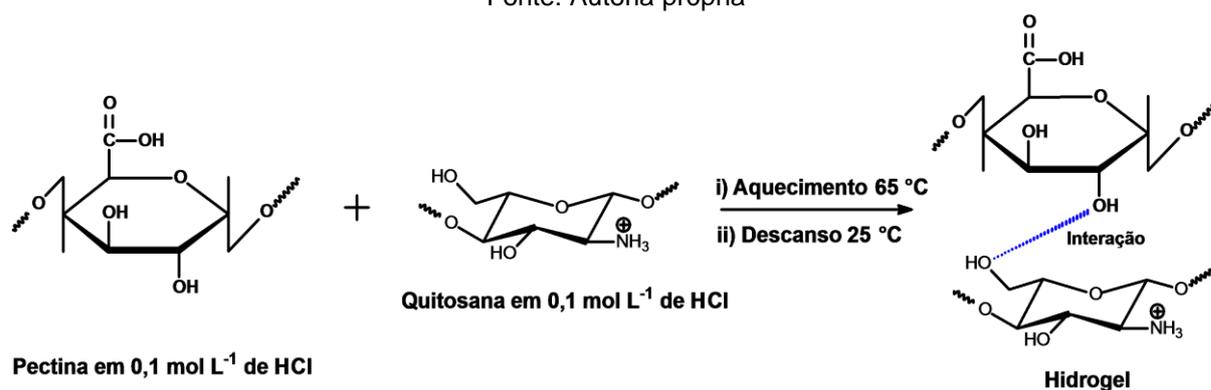
Costa, Ferreira e Cruz (2016) enfatizam que a formação do hidrogel de QT/PEC está relacionado aos valores de pH das soluções em que os polissacarídeos foram preparados, proporcionando a protonação da QT (pH ácido) e a desmetoxilação da PEC (pH básico). Este fator acarreta a formação de polieletrólitos de cargas opostas e alta densidade de carga dos polissacarídeos nas soluções, leva a formação de hidrogéis por complexação iônica entre os grupos catiônicos da QT e os aniônicos da PEC, diminuindo a repulsão eletrostática entre as cadeias polissacarídicas. Este efeito não ocorreu no sistema proposto, pois a PEC não estava ionizada na solução de HCl 0,1 mol L^{-1} . Por isso, a formação do

hidrogel ocorreu (principalmente) por meio de interações de ligações de hidrogênio entre as redes dos polissacarídeos.

Assim, a formação do hidrogel QT/PEC deve-se principalmente a ocorrência de interação intermolecular envolvendo os grupos $-\text{COOH}$ e $-\text{OH}$ da PEC, com os sítios $-\text{OH}$ e $-\text{NH}_3^+$ da QT, ambos protonados em meio ácido (Figura 4). Em $65\text{ }^\circ\text{C}$ o sistema é constituído por uma solução homogênea, no entanto, a diminuição da temperatura para $38\text{ }^\circ\text{C}$ possibilita a formação do hidrogel termossensível. A temperatura de gelificação ($38\text{ }^\circ\text{C}$) foi estabelecida pelo “*tilting method*” (método de inclinação). Durante o esfriamento do sistema, ocorre o estabelecimento de interações intermoleculares e interação íon dipolo entre as cadeias dos polissacarídeos, levando a obtenção do hidrogel. Em altas temperaturas $>38\text{ }^\circ\text{C}$ há maior mobilidade do sistema, impedindo o estabelecimento de interações de curto alcance para formar o hidrogel.

Figura 4 – Precursores do hidrogel e provável estrutura do sistema QT/PEC.

Fonte: Autoria própria



Condições propícias favorecem a ocorrência da gelificação. Neste processo há uma associação intermolecular levando a aglomeração dos polímeros até atingir um ponto crítico. Este ponto específico é determinado ponto de gelificação (ou ponto gel), sendo definido como o parâmetro de maior relevância em todo o processo de gelificação, e caracterizado pelas modificações nas propriedades físicas e viscoelásticas do sistema (MADBOULY; OTAIGE, 2005).

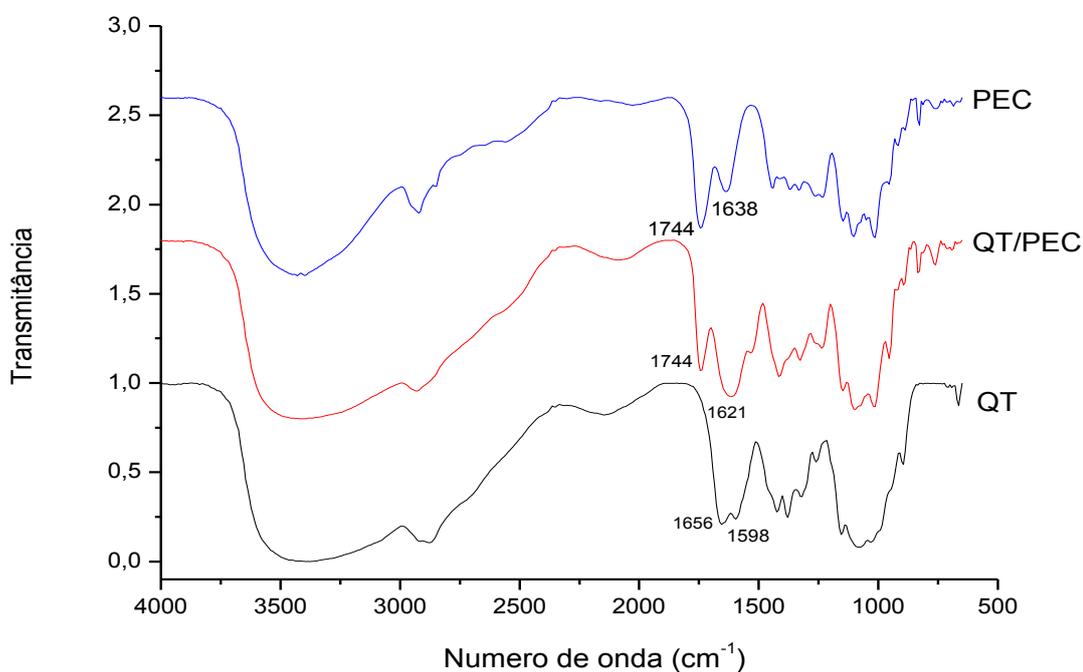
De acordo com a literatura (VENTURA; BIANCO-PELED, 2015), em concentrações baixas de PEC as estruturas dos hidrogéis são estabelecidas sob baixas temperaturas, pois as ligações de hidrogênio são interações dipolares livres que envolvem a interação de átomos de hidrogênio com elementos de alta eletronegatividade, como oxigênio e nitrogênio. Além disso, baixas concentrações de

PEC resultam em quantidades insuficientes de grupos -COOH e grupos -OH para interagir com a QT.

5.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR)

Os polissacarídeos QT e PEC e o hidrogel puro de QT/PEC foram caracterizadas, empregando FTIR, sendo os espectros mostrados na Figura 5. Na figura abaixo são destacadas apenas as bandas que sofreram maior modificação em relação aos espectros citados.

Figura 5 – Espectros de FTIR da QT, PEC e hidrogel QT/PEC.
Fonte: Modelo Cary 630



O espectro FTIR da QT apresentou bandas características em 1656 (desdobramento C=O de amida primária), em 1598 cm^{-1} (desdobramento N-H de amina primária) (MARTINS, et al., 2011).

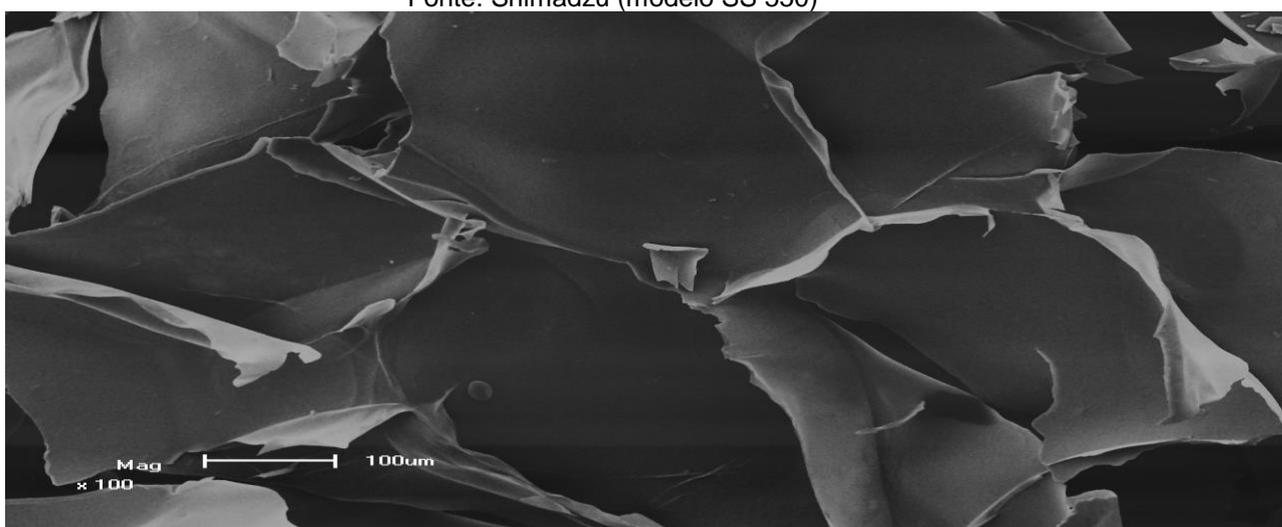
No espectro FTIR da PEC observou-se bandas características em 1744 cm^{-1} (estiramento C=O de éster e de ácido carboxílico), em 1638 cm^{-1} (relativamente aos grupos carboxilato) (ALMEIDA et al., 2015).

Com relação ao espectro FTIR do hidrogel QT/PEC pode-se observar bandas específicas e, bem definidas que comprovam a formação do hidrogel, como: a banda em 1744 cm^{-1} (permanece o estiramento assimétrico e simétrico da carbonila (C=O) e o alargamento da banda em 1621 cm^{-1} devido à sobreposição de bandas de C=O de amida e íon carboxilato, permitindo confirmar a formação do hidrogel QT/PEC.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM)

A investigação morfológica do hidrogel foi realizada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM). Imagens de SEM do hidrogel estão apresentadas na Figura 6. A partir da Figura 6, (escala de $100\text{ }\mu\text{m}$) observa-se que o hidrogel possui superfície lisa e porosa, contendo regiões frágeis.

Figura 6 – Micrografia do hidrogel QT/PEC ampliada em 100x.
Fonte: Shimadzu (modelo SS 550)



Para calcular o tamanho médio dos poros foram selecionados 5 poros na imagem apresentada. A amostra do hidrogel de QT/PEC apresentou tamanho médio

de poro de $364 \pm 122 \mu\text{m}$. Pela quantidade e tamanho dos poros, o hidrogel se caracteriza como sendo um material super-poroso, sendo estes bem definidos, mas com elevada polidispersividade. A elevada polidispersividade está relacionada ao processo de reticulação física, pois não há como controlar o mesmo. Sendo assim, a superfície porosa do hidrogel, sugere que este sistema possa principalmente ser útil para atuar como um suporte para promover crescimento de células. O elevado tamanho médio dos poros é ideal para acomodação de células, funcionando como um sítio ativo para adesão e proliferação celular.

5.4 DIFRAÇÃO DE RAIO-X (WAXS)

Na Figura 7 é apresentado o difratograma do hidrogel QT/PEC e dos polissacarídeos QT e PEC. Para a PEC os picos de difração ocorrem em $2\theta = 24^\circ$, 25° e 34° . A presença destes picos caracteriza este polissacarídeo como um material de regiões ordenadas, devido à ocorrência de interações intermoleculares entre os segmentos de cadeia do polissacarídeo.

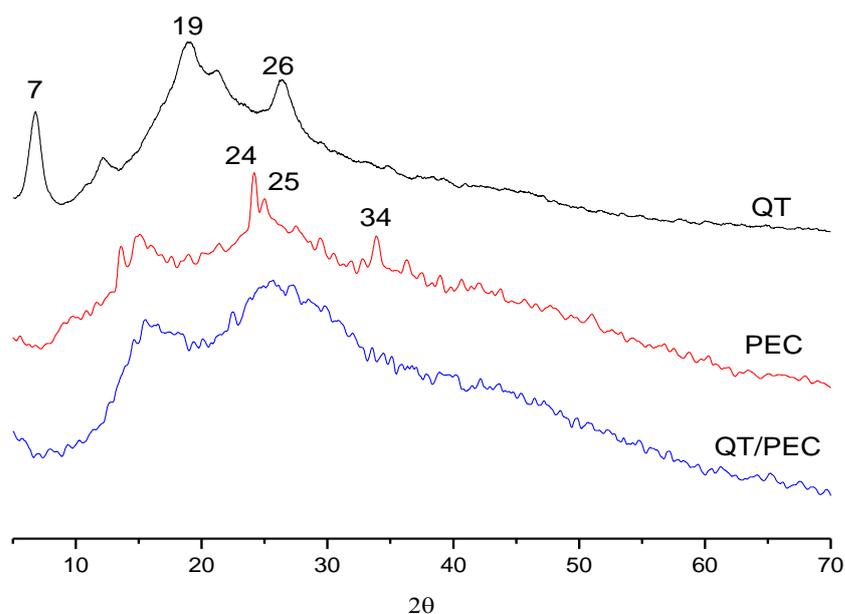


Figura 7 – Difratogramas da QT, PEC e do hidrogel QT/PEC
Fonte: Shimadzu XRD-600

No difratograma da QT observa-se picos de difração na região $2\theta = 7^\circ$, 19° e 26° , caracterizando também uma estrutura com regiões ordenadas. Os planos cristalográficos deste polissacarídeo dependem de inúmeros fatores, como: fonte de extração, grau de acetilação, dentre outros (JAWORSKA et al., 2003). Sabe-se que quanto maior o grau de acetilação, mais alta a cristalinidade da quitosana (BRANT, 2008). Segundo Martins et al., (2011) e Piai, Rubira e Muniz (2009) os valores correspondentes a estes picos de difração da QT são justificados pela grande intensidade de interação via ligações de hidrogênio envolvendo os segmentos da cadeia polimérica.

O difratograma do hidrogel QT/PEC não apresenta nenhum pico de difração estreito e intenso. Esta ausência classifica o hidrogel analisado como um material amorfo, sem a formação de regiões de estrutura ordenada. Entretanto, observam-se dois halos alargados na faixa de 10° a 30° . Isso caracteriza o hidrogel como sendo de característica amorfa.

5.5 ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE

Após a caracterização das propriedades físicas do hidrogel QT/PEC, foram analisados os efeitos citotóxicos dos polissacarídeos QT, PEC e do hidrogel QT/PEC sobre células cancerígenas (HT-29) e células saudáveis (células VERO). A análise de citotoxicidade consiste no primeiro processo em averiguar a biocompatibilidade de um material. A aplicação de testes *in vitro* funciona como uma triagem inicial durante a primeira etapa avaliativa de biocompatibilidade, permitindo a inutilidade de animais para pesquisa (MOMESSO, 2010). Williams (1989) enfatiza que o objetivo de analisar a citotoxicidade de um material consiste em verificar sua biocompatibilidade, analisando o funcionamento do mesmo por uma resposta apropriada do hospedeiro com relação a uma aplicação peculiar.

Com intuito de avaliar o limiar de toxicidade do hidrogel, ensaios de viabilidade celular foram realizados com as amostras de QT, PEC e o hidrogel QT/PEC em 48 h de incubação, utilizando concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$. Segundo

consta na literatura, as células VERO são indicadas para análises de citotoxicidade (KIRPATRICK, 1992). Os resultados de citotoxicidade (CC_{50} – concentração citotóxica média) das amostras, bem como dos controles positivos utilizados estão mostrados nas Tabelas 1 e 2.

Analisando comparativamente os resultados para as células VERO, pode-se observar que a PEC foi o material de maior citotoxicidade para estas células, inibindo o crescimento para 58%, enquanto o hidrogel QT/PEC e QT inibiram 83% e 90%, respectivamente (Tabela 1). Todos estes dados de inibição celular foram obtidos a partir da concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Somente a amostra controle foi utilizada a 50 $\mu\text{g/mL}$ (controle positivo Anfotericina B). A CC_{50} da PEC foi avaliada em 415 ± 21 $\mu\text{g/mL}$, sendo que para as outras amostras a CC_{50} foi maior que 1000 $\mu\text{g/mL}$. Isso demonstrou a excelente biocompatibilidade do hidrogel QT/PEC sobre as células VERO, potencializando aplicações médicas do hidrogel proposto neste trabalho.

Tabela 1 - Resultados de citotoxicidade sobre a célula VERO.

COMPOSTOS	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	INIBIÇÃO (%)*
PEC	415 ± 21	$58,0 \pm 3,4$
QT	>1000	$9,81 \pm 2,8$
QT/PEC	>1000	$15,4 \pm 4,5$
Controle: Anfotericina B	$8,2 \pm 1,6$	$94,0 \pm 2,1^{**}$

*Dados obtidos a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (n=3)

**Dado obtidos a 50 $\mu\text{g/mL}$ (n=3)

Tabela 2 - Resultados de citotoxicidade sobre a célula HT-29.

COMPOSTOS	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	INIBIÇÃO (%)*
-----------	--------------------------------	---------------

PEC	>1000	42,8 ± 3,9
QT	>1000	38,0 ± 8,3
QT/PEC	>1000	33,3 ± 9,4
Controle: Miltefosina	1,9 ± 0,4	96,9 ± 0,1**

*Dados obtidos a 1000 µg/mL (n=3)

**Dados obtidos a 50 µg/mL (n=3)

Para as células HT-29 os polissacarídeos PEC e QT, respectivamente, apresentaram maior citotoxicidade do que o hidrogel QT/PEC, com valor de inibição celular de 42,8% e 38%, enquanto o hidrogel mostrou inibição de 33,3% (Tabela 2) Os resultados de inibição dependem da linhagem celular utilizada. Por meio do teste de inibição, verificou-se que o hidrogel possuiu menor citotoxicidade para ambas as células estudadas. Este efeito confirma também a formação do novo material, constituído por QT e PEC. Para as células HT-29 foi utilizado o fármaco MILTEFOSINA como controle positivo, na concentração de 50 µg/mL.

É importante ressaltar que analisando comparativamente a citotoxicidade do hidrogel QT/PEC em relação às células VERO e HT-29 pode-se afirmar que o hidrogel QT/PEC foi mais citotóxico contra as células HT-29, em comparação com as células VERO. Este resultado demonstra uma grande vantagem, pois o hidrogel QT/PEC pode apresentar biocompatibilidade sobre tecidos saudáveis aumentando o espectro de aplicação do material na área médica.

Em relação aos polissacarídeos (QT e PEC), observou-se que o efeito citotóxico da PEC foi evidente tanto contra as células cancerígenas quanto para as células saudáveis.

5.6 CULTURA DE CÉLULAS

Pelo fato das micrografias de SEM constatarem a superfície porosa no hidrogel e o mesmo apresentar tamanho médio de poros ideais (>300 µm), analisou se a estrutura morfológica seria propícia para promover cultura de células. Este

ensaio foi realizado a partir de células pré-osteoblastos (célula MC3T3-E1), utilizando o hidrogel QT/PEC como matriz suporte - scaffold.

Tabela 3 - Resultados de viabilidade celular sobre as células MC3T3-E1.

Viabilidade celular (%)*			
Amostras	2 Dias	5 Dias	10 Dias
QT/PEC	113±0.7	118.9±4	124.2±2
Controle	100±0	100±0	100±0

*Dados expressados com n = 3.

O período de adesão celular ao hidrogel é considerado primordial para que ocorra o processo de interação célula-biomaterial. Esta etapa está relacionada ao reconhecimento morfológico, ligação e interação com o substrato, para que assim haja afinidade celular. Após as células estarem aderidas a estrutura do hidrogel, inicia-se o processo de reprodução, produção de nova matriz celular e fenótipo celular (YANG et al., 2002; SANTOS et al., 2004).

Através dos resultados obtidos, observa-se que o hidrogel QT/PEC é um excelente material para promover o crescimento celular das células MC3T3-E1, sendo altamente biocompatível para proliferação celular, aumentando a viabilidade celular para 24,2% nos primeiros 10 dias de estudo, quando comparado ao controle negativo (células MC3T3-E1 incubadas sem a presença do hidrogel).

A sobrevivência das células por um período de até 10 dias em contato com o hidrogel indica que a composição química do sistema não foi tóxico sobre as células, pelo contrário, o hidrogel foi potencializador de crescimento celular, indicando que as células se adaptaram a estrutura porosa 3D do material, se acomodando entre os poros, para que ocorresse o crescimento. Neste caso, o hidrogel mimetizou o ambiente extracelular, possibilitando excelente interação para com as células e consequente crescimento celular. As células não apresentaram comportamento de apoptose (morte celular programada), classificando o hidrogel como potencial para atuar como matriz suporte de crescimento celular das células de tecido ósseo,

abrindo perspectivas para ensaios *in vivo*. Neste sentido, o hidrogel a base de QT/PEC pode ser um promissor candidato para promover reparação e crescimento de tecidos ósseos (WERNER et al., 2012; e ELISSEEFF et al., 2006).

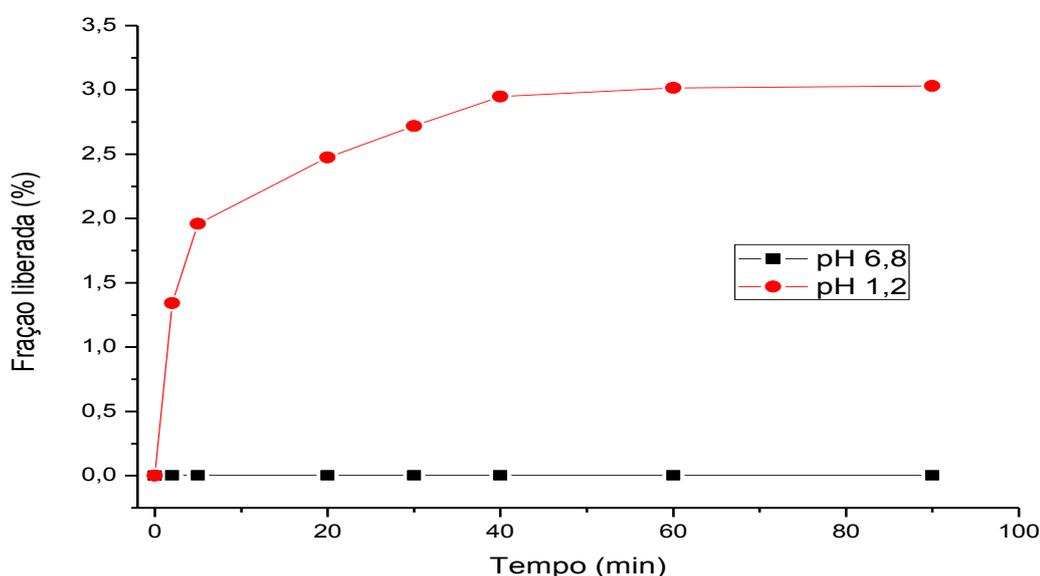
Birch et al. (2015) utilizou um hidrogel de QT/PEC obtido a pH 7.4 em meio salino de NaCl e utilizou este hidrogel para analisar a proliferação e o crescimento celular em cultura de células derivadas da medula humana (células-tronco mesenquimais). O hidrogel foi obtido em condições biologicamente compatíveis (pH = 7,4), utilizando quantidade apropriada de NaCl para reter as interações eletrostáticas entre as cadeias poliméricas, gerando um hidrogel termossensível, com tamanho de poros de apenas 30 μm . Como resultado o respectivo hidrogel demonstrou ser um material compatível para curativo de feridas. Entretanto, dependente da quantidade de sal utilizada, o hidrogel pode tornar-se um material citotóxico, reduzindo seu potencial biomédico. O meio salino promoveu a diminuição do tamanho de poros do hidrogel, quando comparado ao resultado obtido neste estudo em até 12 vezes. Os pares iônicos entre os íons do NaCl e o grupos ionizáveis dos polissacarídeos blindam a repulsão entre os grupos $-\text{NH}_3^+/-\text{NH}_3^+$ e $-\text{COO}^-/-\text{COO}^-$ reduzindo o tamanho dos poros. O efeito salino também inibe a interação eletrostática destes íons de carga oposta, suprimindo a formação de hidrogéis estabelecidos principalmente via interação de Coulomb. Comparado este sistema com o hidrogel proposto neste trabalho, vale a pena ressaltar que o hidrogel desenvolvido nesta oportunidade possui grande potencial para atuar como scaffold, devido sua biocompatibilidade e excelente potencial sobre as células de tecido ósseo de ratos.

5.7 LIBERAÇÃO CONTROLADA

Para verificar a liberação controlada do antioxidante na matriz do hidrogel verificou-se que a eficiência de encapsulação do hidrogel foi de apenas 3,36%. O hidrogel encapsulou somente 0,00037g de ácido gálico. O hidrogel não apresentou afinidade para com o ácido gálico e, por isso, a eficiência de encapsulação foi baixa. Assim como a PEC, o ácido gálico também tem característica aniônica. A encapsulação foi feita a partir de uma solução de ácido gálico, em água destilada (pH \approx 6). Sabe-se que nesta condição a PEC (que está em excesso na matriz do

hidrogel) e o ácido gálico possuem os seus grupos carboxílicos ionizados; portanto, a repulsão entre estes reduziu a eficiência de encapsulação para apenas 3,36%. A Figura 8 ilustra o perfil de liberação do ácido gálico, utilizando o hidrogel QT/PEC como matriz carreadora, nos meios fluido gástrico simulado (pH = 1,2) e fluido intestinal simulado (pH 6,8).

Figura 8 – Cinéticas de liberação do ácido gálico (n =3).
Fonte: autoria própria



Através da curva de liberação obtida a pH 1,2 observou-se uma liberação rápida do ácido gálico em apenas 40 minutos, estabilizando-se a partir deste tempo. Esse resultado é muito ruim, uma vez que a liberação não pode ocorrer de forma brusca, e a mesma ainda ocorre na região gastrointestinal. Isso aumentaria rapidamente a concentração do fármaco no corpo humano, elevando os riscos de citotoxicidade. Esse modelo se assemelha ao tratamento convencional, pois muitas vezes quando as pessoas ingerem algum tipo de medicamento, a concentração ultrapassa a faixa terapêutica de concentração, aumentando a toxicidade sobre o organismo. A liberação brusca se deve a dois motivos: (i) o hidrogel é muito poroso e isso possibilita uma difusão muito rápida de moléculas de água, (ii) o ácido gálico deve ter se adsorvido na superfície do material, permitindo a liberação brusca. Já no meio de fluido intestinal (pH 6,8) o fármaco não foi liberado. Esse fator e o resultado

obtido de liberação (fração de ácido gálico liberada em pH 1,2 iguala a $\approx 3.0\%$), podem ser explicados pela baixa estabilidade do ácido gálico em solução. Neste caso, o hidrogel não atuou como matriz protetora do mesmo, por isso os resultados foram insatisfatórios.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O hidrogel QT/PEC foi facilmente obtido nas proporções de cada polissacarídeo utilizado. Após liofilizado, análises de SEM constataram a elevada porosidade do hidrogel, característica positiva deste material, pois permite analisá-lo para verificar se possui uma superfície propícia para cultura de células. Em relação à citotoxicidade, o hidrogel QT/PEC foi mais citotóxico para células cancerígenas (HT-29) do que para as células saudáveis (VERO). Este resultado é satisfatório, classificando o material como biocompatível. Entretanto, quando comparado aos polissacarídeos puros, o hidrogel possuiu baixa citotoxicidade para ambas as células estudadas, demonstrando que a união de ambos os polissacarídeos eleva a biocompatibilidade do sistema.

Para análise de cultura de células, o hidrogel contribuiu para a proliferação das células de tecido ósseo, aumentando sua população para 24,2% em apenas 10 dias de análise. Este fato comprova que o tamanho médio dos poros do hidrogel possui dimensão suficiente para promover proliferação celular, ou seja, o hidrogel mimetizou a matriz extracelular, promovendo crescimento celular considerável.

A respeito da liberação controlada do ácido gálico, houve liberação em meio gástrico (pH 1,2), sendo o equilíbrio atingindo em 40 minutos de análise. Por outro lado, no meio intestinal (pH 6,8) não houve liberação. Este resultado demonstra a ineficiência deste hidrogel em processos de liberação controlada de ácido gálico devido à brusca liberação do mesmo. Além disso, a liberação ocorreu em meio gastrointestinal.

REFERÊNCIAS

ADRIANO, W. S.; MENDONÇA, D. B.; RODRIGUES, D. S.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. L. C. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2170-2179, 2008.

AHMED, E. M. Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 2, p. 105-121, 2015.

ALMEIDA, E. A. M. S.; FACCHI, S. P.; MARTINS, A. F.; NOCCHI, F.; SCHUQUEL, I. T. A.; NAKAMURA, C.V.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Synthesis and characterization of pectin derivate with antitumor property against Caco-2 colon cancer cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 139-145, 2015.

ALVES, N. M.; MANO, J. F. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 43, p. 401-414, 2008.

AMIRIAN, J.; LINH, N. T. B.; MIN, Y. K.; LEE B-T. The effect of BMP-2 and VEGF loading of gelatin-pectin-BCP scaffolds to enhance osteoblast proliferation. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 2, p., 2015.

ANISHA, S.; KUMAR, S. P.; KUMAR, G. V. GARIMA, G. Hydrogels: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 4, n. 2, p. 98-105, 2010.

AOUADA, F. A. **Síntese e caracterização de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose para liberação controlada de pesticidas**. 2009. 124 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), São Carlos, 2009.

AZEVEDO, J. R.; SIZILIO, R. H.; BRITO, M. B.; COSTA, A. M. B.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S.; SANTOS, M. R. V.; LIRA, A. A. M.; NUNES, R. S. Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p. 685-689, 2011.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 83-99, 2010.

BIRCH, N.P.; BARNEY, L. E.; PANDRES, E.; PEYTON, S. R.; SCHIFFMAN, J. D. Thermal-responsive behavior of a cell compatible chitosan/pectin hydrogel. **Biomacromolecules**, vol. 16, p. 1837-1843, 2015.

BOURGEOIS, S.; GERNET, M.; PRADEAU, D.; ANDREMONT, A.; FATTAL, E. Evaluation of critical formulation parameters influencing the bioactivity of β -lactamases entrapped in pectin beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, n. 1, p. 2-9, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros, Ciência e Tecnologia**, v. 9, n. 3, p.38-44, 1999.

BRANT A. J. C. **Preparação e caracterização de hidrogéis a partir de misturas de soluções de quitosana e poli(N-vinil-2-pirrolidona)**. 2008. 166 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2008.

CHEN, X.; MARTIN, B. D.; NEUBAUER, T. K.; LINHARDT, R. J.; DORDICK, J. S.; RETHWISCH, D. G. Enzymatic and chemoenzymatic approaches to synthesis of sugar based polymer and hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, n. 1, p. 15-21, 1995.

CHO, Y. C.; HWANG, J. K. Modeling the yield and intrinsic viscosity of pectin in acidic solubilization of apple pomace. **Journal of Food Engineering**, v. 44, n. 2, p. 85-89, 2000.

COSTA, M. P. M.; FERREIRA, I. L. M.; CRUZ, M. T. M. New polyelectrolyte complex from pectin/chitosan and montmorillonite clay. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, n. 1, p. 123-130, 2016

CRISPÍN, P. L. M.; CARO, R. R.; VEIGA, M. D. Pectina: usos farmacéuticos y aplicaciones terapéuticas. **Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 78, n.1, p. 81-97, 2012.

DASH, M.; CHIellini, F.; OTTENBRITE, R.; CHIellini, E. Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.

DRESSLER, A. C. **Propriedades reológicas compósitos sol-gel de quitosana/glicerol/nanoelementos**. 2008, 58 p. Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

DU, J.; CHE, P-L.; WANG, Z-Y.; AICH, U.; YAREMA, K. J. Designing a binding interface for control of cancer cell adhesion via 3D topography and metabolic oligosaccharide engineering. **Biomaterials**, v. 32, 5427-5437, 2011.

DU, J.; YAREMA, J. Carbohydrate engineered cells of regenerative medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v, 62, p. 671-682, 2010.

ELIAS, H-G. **An introduction to polymer science**. 1ª Ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1997, 492 p.

ELISSEEFF, J.; FERRAN, A.; VARGHESE, H. S.; ZHANG, S. The role of biomaterials in stem cell differentiation: applications in the musculoskeletal system. **Stem cells and development**, v. 15, n. 3, p. 295-303, 2006.

FACCHI, S. P.; SCARIOT, D. B.; BUENO, P. V. A.; SOUZA, P. R.; FIGUEIREDO, L. C.; FOLLMANN, H. D. M.; NUNES, C. S.; MONTEIRO, J. P.; BONAFÉ, E. G.; NAKAMURA, C. V.; MUNIZ, E. C.; MARTINS, A. F. Preparation and cytotoxicity of N-modified chitosan nanoparticles applied in curcumin delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 237-245, 2016.

GANCZ, K.; ALEXANDER, M.; CORREDIG, M. In situ study of flocculation of whey protein-stabilized emulsions caused by addition of high methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 2-3, p. 293-298, 2006.

GANJI, F.; ABDEKHODAIE, M. J. Synthesis and characterization of a new thermoreversible chitosan-PEG diblock copolymer. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 435-441, 2008.

GANJI, F.; ABDEKHODAIE, M. J.; RAMAZANY-SADTABADI, A. Gelation time and degradation rate of chitosan as a thermosensitive injectable hydrogel. **Journal Solution-Gel Science Technology**, v. 42, p.47-53, 2007.

GRENHA, A.; GOMES, M. E.; RODRIGUES, M.; SANTO, V. E.; MANO, J. F.; NEVES, N. M.; REIS, R. L. Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 92, n. 4, p. 1265-1272, 2009.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60 n. 15, p. 1638-1649, 2008.

HENNINK, W. E.; VAN NOSTRUM, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n.1, p. 13-36, 2002.

HORST, B. L. **Microencapsulação do corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana e quitosana/alginate das técnicas de impregnação, coacervação e *spray drying***. 2009. 102 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2009.

JAWORSKA, M.; SAKURAI, K.; GAUDON, P.; GUIBAL, E. Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties. **International Polymers**, v. 52, p. 198-205, 2003.

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, p. 227-232, 2010.

JIANG, X.; CHEN, L.; ZHONG, W. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, nº 4, p. 457-463, 2003.

KATIME, I.; KATIME, O.; KATIME, D. **Los Materiales inteligentes de este milenio: los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones**. Bilbao, Servicio Editorial de La Universidad Del País Vasco, 2004. 335 p.

KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, p. 2339-2349, 2003.

KIRITOSHI, Y.; ISHIHARA, K. Synthesis of hydrophilic cross-linker having phosphorylcholine-like linkage for improvement of hydrogel properties. **Polymer**, v. 15, n. 22, p. 7499-7504, 2004.

KIRPATRICK, C. J. Biological testing of materials and medical devices – a critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity in vitro. **Regulatory Affairs**, vol. 4, n. 1, 13-32, 1992.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 51-63, 2010

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme Microbial Technology**, v. 35, p.126-139, 2004.

KUBOTA, N.; TASTUMOTO, N.; SANO, T.; TOYA, K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. **Carbohydrate Research**, v. 324, n. 4, p. 268-274, 2000.

LAVORGNA, M.; ATTIANESE, I.; BUONOCORE, G. G.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A.; TESCIONE, F. MTT-supported Ag nanoparticles for chitosan nanocomposites: structural properties and antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 385-392, 2014.

LEE, S. J.; PARK, K; OH, Y-K.; KWON, S-H.; HER, S.; KIM, I-S.; CHOI, K.; LEE, S. J.; KIM, H.; LEE, S. G.; KIM, K.; KWON, I. C. Tumor specificity and therapeutic efficacy of photosensitizer encapsulated glycol chitosan-based nanoparticles in tumor bearing mice. **Biomaterials**, v. 30, n. 15, p. 2929-2939, 2009.

LIN, C. C.; METTERS, A. T. Metal-chelating affinity hydrogels for sustained protein release. **Journal of Biomedical Materials Research, Parte A**, v. 83, n. 4, p. 954-964, 2006.

LIU, M.; ZHENG, H.; CHEN, J.; LI, S.; HUANG, J.; ZHOU,C. Chitosan-chitin nanocrystal composite scaffolds for tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p.832-840, 2016.

LOPES, L. C.; SIMAS-TOSIN, F. F.; CIPRIANI, T. R.; MARCHESI, L. F.; VIDOTTI, M.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Effect of low and high methoxyl citrus pectin on the properties of polypyrrole based electroactive hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 11-18, 2017.

MA, X.; WU, H.; LIU, L.; YAO, Q.; WANG, S.; ZHAN, R.; XING, S.; ZHOU, Y. Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 129, n. 1, p. 102-107, 2011.

MADBOULY, S. A.; OTAIGBE, J. U. Rheokinetics of thermal-induced gelation of waterborne polyurethane dispersions. **Macromolecules**, v. 38, p.10178-10184, 2005.

MARTINS, A. F.; PIAI, J. F.; SCHUQUEL, I. T. A.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Polyelectrolyte complexes of chitosan/heparin and N,N,N-trimethyl chitosan/heparin obtained at different pH: I: preparation, characterization, and controlled release of heparin. **Colloid and Polymer Science**, v.289, p. 1133-1144, 2011.

MARTINS, A. F.; PEREIRA, A. G. B.; FAJARDO, A. R.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Characterization of polyelectrolytes complexes based on N,N,N-trimethyl chitosan/heparin prepared at different pH conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1266-1272, 2011.

MATTOSO, L. H. C.; AOUADA, F. A.; MUNIZ, E. C.; VAZ, C. M. P. Correlação entre parâmetros da cinética de intumescimento com características estruturais e hidrofílicas de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose. **Química Nova**, vol. 32, n. 6, p. 1482-1990, 2009.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. de; RODRIGUES, D. S.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P. W.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. L. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1055-1066, 2011.

MESBAHI, G.; JAMALIAN, J.; FARAHNAKY A. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. **Food Hydrocolloids**, vol. 19, n.4, p.731-738, 2005.

MOMESSO, R. G. R. L. P. Incorporação e liberação de resveratrol em hidrogéis poliméricos. 2007. 116 p Dissertação (Ciências na área de tecnologia nuclear – materiais), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2010.

NINAN, N.; MUTHIAH, M.; PARK, I.; ELAIN, A.; THOMAS, S.; GROHENS, Y. Pectin/carboxymethyl cellulose/microfibrillated cellulose composite scaffolds for tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 877-885, 2013.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 677 p.

PAIVA, E. P.; LIMA, M. S.; PAIXÃO, J. A. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímero**, v. 10, n. 4, p. 196-211, 2009.

PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n.1, p. 27-46, 2000.

PIAI, J. F.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Self-assembly of a swollen chitosan/chondroitin sulfate hydrogel by outward diffusion of the chondroitin sulfate chains. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 7, p. 2601-2609, 2009.

QIAN, J.; YONG, X.; XU, W.; JIN, X. Preparation and characterization of bimodal porous poly (γ -benzyl-L-glutamate) scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 8, p. 4587-4593, 2013.

RABEA, E. I.; BADAWY, M. E. -T; STEVENS, C.V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

RAO, R. R.; STEGEMANN, J.P. Cell-bases approaches to the engineering of vascularized bone tissue. **The Journal of Cell Therapy – Cytotherapy**, v. 15, n.11, p. 1309-1322, 2013.

RECILLAS, M.; SILVA, L. L.; PENICHE, P.; GOYCOOLEA, F. M.; RINAUDO, M.; ROMÁNE, J. S. Thermo and pH-responsive polyelectrolyte complex membranes from chitosan-g-N-isopropylacrylamide and pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1336-1343, 2011.

REDDY, P. R.S.; ESWARAMMA, S.; KRISHNA RAO, K. S. V.LEE, LEE, Y. I. Dual responsive pectin hydrogels and their silver nanocomposites: swelling studies, controlled drug delivery and antimicrobial applications. **Bull. Korean Chemistry Society**, v. 35, n. 8, p. 2391-2399, 2014.

RIEGER, K. A.; BIRCH, N. P.; SCHIFFMAN, J. D. Designing electrospun nanofiber mats to promote wound healing. A review. **Journal of Materials Chemistry B**. v. 1, n. 36, p. 4531-4541, 2013.

ROBERTS, G. A. F.; **Chitin Chemistry**. London: The Macmillan Press. 1992. 350 p.

ROOHANI-ESFAHANI, S.-I.; CHEN, Y.; SHI, J.; ZREIQAT, H. Fabrication and characterization of a new, strong and bioactive ceramic scaffold for bone regeneration. **Materials Letters**, v. 107, p. 378-381, 2013.

RUDZINSKI, W. E.; DAVE, A. M.; VAISHNAV, U. H.; KUMBAR, S. G.; KULKARNI, A. R.; AMINABHAVI, T. M. Hydrogels as controlled release devices in agriculture. **Designed Monomers Polymers**, v. 5, n. 1, p. 39-65, 2002.

SALAZAR, M. J. C. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina e quitosana-colágeno visando a liberação de fármacos**. 2015. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, 2015.

SANTOS, A. R.; FERREIRA, B. M. P.; DUEK, E. A. R.; DOLDER, H.; WADA, R. S.; WADA, M. L. F. Differentiation patter of vero cells cultured on Poly(L-lactic acid)/ Poly(Hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) blends. **Artificial Organs**, v. 28, n. 4, p. 381-389, 2004.

SHEKAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n.1-2, p.19-38, 2001.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R. M.; MARCANTONIO, R. A. C; MARCANTONIO-JÚNIOR, E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, vol. 37, n.2, p. 155-161, 2008.

SRIAMORNSAK, P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review. **Silpakorn University Journal of Sciences, Humanities and Arts**, v. 3, n. 1-2, p. 206-228, 2003.

SUNGTHONGJEEN, S.; PITAKSUTTEEPONG, T.; SOMSIRI, A.; SRIAMORNSAK, P. Studies of pectins as potential hydrogel matrices for controlled-release drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n.12, p. 1271-1276, 1999.

SUNGTHONGJEEN, S.; SRIAMORNSKA, P.; PITAKSUTTEEPONG, T. SOMSIRI, A.; PUTTIPIPATKHACHORN, S. Effect of degree of esterification of pectin and calcium amount on drug release from pectin-based matrix tablets. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 5, p. 1-8, 2004

TSAI, Y-M.; CHIU, C-C.; LIN, P-C.; CHEN, S-H.; HUANG, S-J.; WANG, L-F. Antitumor efficacy of doxorubicin released from crosslonked nanoparticule chondroitin sulfate/chitosan polyelectrolyte complexes. **Macromolecular bioscience**, v. 11, n. 5, p. 680-688, 2011.

UNAGOLLA, J. M.; ADIKARY, S. U. Adsorption characteristics of cadmium and lead heavy metals into locally synthesized chitosan biopolymer. **Tropical Agricultural Research**, v. 26, n. 2, p. 395-401, 2015.

UNAL, B.; HEDDEN, R. C. Gelation and swelling behavior of end-linked hydrogels prepared from linear poly (ethylene glycol) and poly (amidoamine) dendrimers. **Polymer**, v. 47, n. 24, p. 8173-8182, 2006.

VAN DER LINDEN, H. J.; HERBER, S.; OLTHIUS, W.; BERGVELD, P. Patterned dual pH responsive core shell hydrogels with controllable swelling kinetics and volume. **Analyst**, v. 128, p. 325-331, 2003.

VANDAMME, T. F.; LENOURRY, A.; CHARRUEAU, C.; CHAUMEIL, J. C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p. 219-231, 2002.

VARGHESI, S.; ELISSEEFF, J. H. Hydrogels for musculoskeletal tissue engineering. **Journal Polymers in Regenerative Medicine**. v. 203, p. 95-144, 2006.

VENTURA, I.; BIANCO-PELED, H. Small-angle X-ray scattering study on pectin-chitosan mixed solutions and thermoreversible gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 122-129, 2015.

WEI, X.; ZHANG, C.; GU, Q. Properties, products, and applications of chitosan. **Chinese Journal Reparative Reconstruction Surgery**, v. 24, p. 1265-1270, 2010.

WERNER, C.; PREWITZ, M.; SEIB, F. P.; POMPE, T. Polymeric biomaterials for stem cell bioengineering. **Molecular Rapid Communications**, v. 33, n. 17, p. 1420-1431, 2012.

WICKLER, L.; KIM, Y.; KIM, M-J.; THIRKIELD, B.; LIN, Z.; JUNG, J. Pectin as a bioactive polysaccharide extracting tailored function from less. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 251-259, 2014.

WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials. **Journal Biomechanics**, v.22, n. 1, p. 79, 1989.

XU, L.; ZHANG, X.; ZHU, C.; ZHANG, Y.; FU, C.; YANG, B. Nonionic polymer cross-linked chitosan hydrogel: preparation and bioevaluation. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 24, n. 13, p. 1564-1574, 2013.

XU, Y.; HAN, J.; LIN, H. Fabrication and characterization of a self-crosslinking chitosan hydrogel under mild conditions without the use of strong bases. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p.372-379, 2016.

YANG, B.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.; TAO, L.; LI, S.; WEI, Y. Facilely prepared inexpensive and biocompatible self-healing hydrogel: a new injectable cell therapy carrier. **Polymer Chemistry**, v. 3, n. 12, p. 3235-3238, 2012.

YANG, J.; BEI, J.; WANG, S. Enhanced cell affinity of poly (D,L-Lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. **Biomaterials**, v. 23, n. 12, p. 2607-2614, 2002.

YOSHIDA, C. M. P.; BASTOS, C. E. N.; FRANCO, T. T. Modeling of potassium sorbate diffusion through chitosan films. **Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p.584-589, 2010.

YOUNG, R. J., LOVELL, P. A. **Introduction to Polymers**, 2^a ed. London: Chapman & Hall, 1994.