

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE  
MATERIAIS**

EWERTON DE OLIVEIRA TEOTÔNIO BEZERRA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE  
GELATINA/TANINO AMINO-FUNCIONALIZADO PARA APLICAÇÕES COMO  
SUPORTES POROSOS NA ÁREA BIOMÉDICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LONDRINA

2019

EWERTON DE OLIVEIRA TEOTÔNIO BEZERRA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE  
GELATINA/TANINO AMINO-FUNCIONALIZADO PARA APLICAÇÕES COMO  
SUPORTES POROSOS NA ÁREA BIOMÉDICA**

Dissertação de mestrado apresentado como pré-requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins

Co-orientador: Prof. Dr. Bruno Henrique Vilsinsk

LONDRINA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

B574d Bezerra, Ewerton de Oliveira Teotônio

Desenvolvimento e caracterização de hidrogéis de gelatina/tanino amino-  
-funcionalizado para aplicações como suportes porosos na área biomédica /  
Ewerton de Oliveira Teotônio Bezerra. - Londrina : [s.n.], 2019.

76 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Henrique Vilsinsk

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.

Londrina, 2019.

Bibliografia: f. 67-76.

1. Compostos poliméricos. 2. Materiais porosos. 3. Biocompatibilidade.  
4. Taninos. 5. Engenharia biomédica. I. Martins, Alessandro Francisco, orient.  
II. Vilsinsk, Bruno Henrique, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de  
Materiais. V. Título.

CDD: 620.11



## TERMO DE APROVAÇÃO

### DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE GELATINA/TANINO AMINO-FUNCIONALIZADO PARA APLICAÇÕES COMO SUPORTES POROSOS NA ÁREA BIOMÉDICA

Por

**EWERTON DE OLIVEIRA TEOTÔNIO BEZERRA**

Dissertação de Mestrado apresentada no dia 04 de Abril de 2019, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Câmpus Londrina, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O mestrando foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após avaliação da Dissertação, a Banca Examinadora considerou a Dissertação **Aprovada**. O presente termo assinado ficará depositado na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais – PPGCEM.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins - Orientador  
(UTFPR – Apucarana)

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Cátia Santos Nunes - Membro Externo  
(UFPR – Palotina)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Elton Gunterdorfer Bonafé - Membro Titular  
(UTFPR - Apucarana)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Cava  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

**“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais”**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar força para superar todos os obstáculos e discernimento nos momentos mais difíceis nesta minha existência.

Aos meus pais (Mesmar e Fátima), pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos, muitas vezes deixando seus sonhos de lado, para que eu pudesse alcançar os meus.

Ao meu irmão Emerson (*in memoriam*), pelo apoio e incentivo para que eu continuasse meus estudos. Quero agradecer por todos os momentos que estive ao seu lado, os quais ficarão guardados eternamente no meu coração e na minha mente.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins pela oportunidade, orientação, ensinamentos repassados e amizade ao longo desse mestrado. Foi um privilégio ter como orientador, um profissional dedicado e sempre atencioso com os seus alunos. Certamente, o exemplo e os conselhos dados servirão como referência na minha vida profissional.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Bruno Henrique Vilsinsk, pela amizade, dicas e contribuições dadas ao longo desse mestrado.

A todos os professores que fazem parte do grupo de pesquisa de materiais, macromoléculas e compósitos - LA2MAC (Profs. Elton Bonafé, Johny Monteiro e Sandro Venter) pelas dicas e ajuda em diversos momentos da pesquisa. E aos demais do grupo de pesquisa, em especial aos amigos e colegas de trabalho Débora Almeida, Fernanda, Joziel, Ariel, Bruno, Débora Facchi, Jéssica, Evandro e Ana Beatriz pela amizade e apoio. Além da Sharise, pela ajuda no ensaio antimicrobiano e a Daphne pela ajuda no laboratório no início do mestrado.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação de Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Campus Londrina pela oportunidade de realização desse mestrado.

À parceria desenvolvida com a Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela realização de caracterizações, como o FTIR e análise reológica. E a parceria com a Colorado State University (CSU), pela realização do XPS, SEM e ensaios biológicos.

Ao Limerick Institute of Technology (LIT) e a União Européia, através do Programa Erasmus+, pela oportunidade do intercâmbio e a bolsa concedida.

E a todos que contribuíram direta e/ou indiretamente para o cumprimento de mais uma etapa em minha vida.

“Deus não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança”.

Albert Einstein

## RESUMO

BEZERRA, Ewerton O. T. Desenvolvimento e caracterização de hidrogéis gelatina/tanino amino-funcionalizado para aplicações como suportes porosos na área biomédica. 2019. 76 f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2019.

Este trabalho propõe pela primeira vez o preparo de hidrogéis físicos a base de gelatina (GE) e um derivado de tanino condensado amino-funcionalizado (comercialmente denominado de tanfloc; TN). Inicialmente, antes de preparar os hidrogéis, solução de TN (5% m/v) foi purificada por meio do processo de diálise (5 dias). Verificou-se que o TN é formado principalmente por oligômeros (massa molar < 12 kDa). Ainda, confirmou-se por meio das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (SEM), acoplado a um detector de energia dispersiva de raio-X (EDS) e espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), que o TN como recebido, apresenta íons cloreto, cálcio e potássio como impurezas em sua composição. A estrutura do TN comercial apresenta-se compacta, organizada e esférica, enquanto o TN purificado evidenciou uma estrutura frágil sem organização. A solução de TN dialisada foi utilizada para preparar os hidrogéis GE/TN. Soluções aquosas de GE e TN foram misturadas (50°C) para conceber blendas estáveis. Então, as blendas GE/TN foram acondicionadas a 4°C (24 h). Após, foram obtidos pela primeira vez hidrogéis GE/TN termossensíveis, sendo a temperatura de gelificação dos hidrogéis determinada por medidas do módulo de armazenamento (G') em função da temperatura. Os hidrogéis GE/TN foram caracterizados por meio de ensaios reológicos, espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) e SEM. Os ensaios reológicos revelaram que os hidrogéis apresentam temperatura sol-gel acima da temperatura do corpo humano (37°C). Imagens SEM mostraram uma morfologia com poros interconectados, distribuídos de forma irregular na superfície dos materiais. A amostra GE90/TN10 (formada por meio de uma blenda com 90 vol% de GE (4,0% m/v) e 10 vol% de TN) apresentou atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (*E. coli*) devido à difusão de TN na placa de cultura do microrganismo, enquanto que a amostra GE50/TN50 (formada por meio de uma blenda com 50 vol% de GE (4,0% m/v) e 50 vol% de TN) não apresentou halo de inibição contra *E. coli*. Este efeito se deve à maior estabilidade do hidrogel GE50/TN50 em solução PBS por até 7 dias. Devido à essa propriedade, esse hidrogel físico foi aplicado como matriz *scaffold* para promover adesão e proliferação de células tronco mesenquimais do tecido ósseo (BMSCs). O hidrogel GE50/TN50 apresentou citocompatibilidade com células BMSCs. Ainda, imagens de fluorescência e SEM revelaram que o hidrogel GE50/TN50 atuou como *scaffold*, pois em 7 dias, a matriz promoveu fixação, proliferação e o espalhamento de células BMSCs em sua superfície. Esse material a base de GE e TN apresenta potencial aplicação na área de engenharia de tecidos, atuando como matriz *scaffold*.

**Palavras-Chave:** Hidrogéis, *Scaffolds*, Engenharia de Tecidos, Taninos, Citocompatibilidade.

## ABSTRACT

BEZERRA, Ewerton O. T. Development and characterization of gelatin/amino-functionalized hydrogels for applications as porous supports in the biomedical area. 2019. 76 f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2019.

This work proposes for the first time the preparation of physical hydrogels based on gelatin (GE) and an amino-functionalized condensed tannin derivative (commercially called tanfloc; TN). Firstly, before preparing the hydrogels, TN solution (5% w/v) was purified by the dialysis process (5 days). It has been found that TN is primarily formed by oligomers (molar weight < 12 kDa). It was also confirmed by means of scanning electron microscopy (SEM), coupled to an X-ray dispersive energy detector (EDS), infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), that the as-received TN presents chloride, calcium and potassium ions as impurities in its composition. The structure of the commercial TN is compact, organized and spherical, whereas the purified TN shows a brittle structure without organization. The dialyzed TN solution was used to prepare the GE/TN hydrogels. Aqueous solutions of GE and TN were mixed (50 °C) to design stable blends. Then, GE/TN blends were conditioned at 4 °C (24 h). Afterward, thermosensitive GE/TN hydrogels were obtained for the first time, being the gelling temperatures of the hydrogels determined by measurements of the storage modulus (G') as a function of the temperature. GE/TN hydrogels were characterized by rheological tests, FTIR, XPS and SEM. Rheological tests revealed that the hydrogels had a sol-gel temperature above the human body temperature (37 °C). SEM images showed a morphology with interconnected pores, which are irregularly distributed on the hydrogel surfaces. The GE90/TN10 sample (formed from a blend composed of 90 vol% GE (4.0% w/v) and 10 vol% TN) showed antimicrobial activity against *Escherichia coli* (*E. coli*) due to the diffusion of TN in the culture plate seeded with the bacterium, while the GE50/TN50 sample (formed from a blend composed of 50 vol% GE (4.0% w/v) and 50 vol% TN) showed no inhibition halo against *E. coli*. This effect is due to the greater stability of the GE50/TN50 hydrogel in PBS solution for up to 7 days. Because of this property, this physical hydrogel was applied as a scaffold matrix to promote adhesion and proliferation of bone mesenchymal stem cells (BMSCs). The GE50/TN50 hydrogel presented cytocompatibility with BMSCs. Furthermore, fluorescence and SEM images revealed that the GE50/TN50 hydrogel acted as scaffold, because within 7 days the matrix promoted fixation, proliferation and spreading of BMSCs on its surface. This material based on GE and TN presents can have a potential application in the tissue engineering field, acting as a *scaffold* matrix.

**Keywords:** Hydrogels, *Scaffolds*, Tissue Engineering, Tannins, Cytocompatibility.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas hipotéticas de um hidrogel químico e um hidrogel físico. ....	14
Figura 2 – Estrutura química geral da GE. ....	19
Figura 3 – (A) Estrutura química de taninos condensados. (B) Estrutura química de taninos hidrolisáveis. Os grupos hidroxila da D-glicose estão esterificados com ácidos gálicos. ....	22
Figura 4 – Estrutura química do TN (cátion orgânico). Reproduzido de Martins et al., 2018 com permissão da Elsevier. ....	24
Figura 5 – Processo de diálise do TN. ....	36
Figura 6 – (A) Micrografia e (B) espectro EDS do TN não purificado. Reproduzido de Martins et al., 2018 com permissão da Elsevier. ....	37
Figura 7 – (A) Micrografia e (B) espectro EDS do TN purificado (obtido após diálise). Reproduzido de Martins et al., 2018 com permissão da Elsevier. ....	38
Figura 8 – Espectros de FTIR do TN antes (a) e após (b) diálise. ....	39
Figura 9 – Solução de TN recém dialisada, obtida após 5 dias de diálise (Fig. 9A), e solução de TN dialisada e congelada, mostrando a formação de precipitados de TN (Figs. 9B e 9C). ....	40
Figura 10 – Espectros XPS (survey) do TN antes e após purificação. ....	41
Figura 11 – Espectros de alta resolução dos envelopes C1s e O1s obtidos na superfície do TN purificado. ....	42
Figura 12 – Imagem digital do sistema preparado com GE a 1,0% m/v na razão GE/TN 50/50 v/v. Nesse caso, não houve gelificação da blenda GE/TN. ....	44
Figura 13 – Imagens digitais do sistema preparado com GE a 4,0% m/v na razão GE/TN 50/50 v/v: (A) blenda GE/TN a 50°C e (B) hidrogel GE/TN obtido a 4°C. ....	44
Figura 14 – Medidas de G' em função da temperatura para os sistemas GE/TN produzidos a partir das condições experimentais previstas na Tabela 2. ....	47
Figura 15 – Medidas de G' e G'' em função da frequência para os sistemas GE/TN preparados a partir de blendas com GE a 4,0% m/v e proporção GE/TN (v/v): (A) 50/50 e (B) 90/10. ....	48
Figura 16 – Espectros FTIR dos precursores GE, TN e dos hidrogéis GE/TN. ....	49

Figura 17 – Espectros XPS (survey) dos hidrogéis GE/TN obtidos a partir de blendas com solução GE a 4% m/v em diferentes proporções GE/TN (50/50 e 90/10). .....	51
Figura 18 – Espectros de alta resolução dos envelopes O1s, N1s e C1s.....	52
Figura 19 – Micrografias das seções transversais (obtidas via fratura) dos hidrogéis GE50/TN50 e GE90/TN10 processados após liofilização. ....	55
Figura 20 – Imagem digital da placa de cultura de <i>E. coli</i> contendo discos com os controles positivos, gentamicina (halo menor) e ciprofloxacina (halo maior). ....	57
Figura 21 – Atividade antimicrobiana (em termos da formação de halo de inibição) promovidos por discos (6,0 mm) dos hidrogéis GE50/TN50 e GE90/TN10 contra <i>E. Coli</i> após 24 h de incubação a 37 °C. ....	58
Figura 22 – Resultados de viabilidade celular promovidos pelas amostras GE/TN, titânio (controle positivo) e células (controle negativo) sobre células BMSCs depois de 4 dias de análise. O termo * indica resultado significativamente diferente com $p$ ao menos $\leq 0,05$ .....	61
Figura 23 – Imagens de fluorescência da superfície do hidrogel GE50/TN50 contendo as BMSCs. As imagens foram obtidas após 4 e 7 dias de análise.....	63
Figura 24 – Imagens SEM do hidrogel GE50/TN50 em contato com as células BMSCs após 4 e 7 dias de cultura celular.....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química e valores de pK <sub>a</sub> dos aminoácidos constituintes da GE.....	20
Tabela 2 – Condições experimentais utilizadas no preparo dos hidrogéis GE/TN a partir de blendas GE/TN com volume final de 6,0 mL. ....	26
Tabela 3 – Temperaturas de gelificação (T <sub>sol-gel</sub> ) dos hidrogéis GE/TN processados de acordo com as condições descritas na Tabela 2.....	47
Tabela 4 – Razão dos grupos –COO– e –NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> dos sistemas GE/TN. ....	53
Tabela 5 – Percentual relativo de grupos –NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> e razão –NH <sub>2</sub> /–NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> nos hidrogéis GE/TN determinados por meio dos espectros XPS de alta resolução N1s.....	54
Tabela 6 – Resultados de desintegração dos hidrogéis GE50/TN50 e GE90/TN10 em PBS (pH 7,4) e SGF (pH 1,2) obtidos de soluções GE a 4,0% m/v. ....	56
Tabela 7 – Halos de inibição (mm) do hidrogel em comparação com dois antimicrobianos. ....	58

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BMSCs	Células tronco mesenquimais do tecido ósseo
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CSU	Colorado State University
DAPI	4',6-diamidino-2- fenilindole
DPPH•	Método de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ECM	Membrana extracelular
FBS	Soro fetal bovino
FTIR	Espectroscopia na região do Infravermelho
GE	Gelatina
GEN	Gentamicina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difenil tetrazólio
PBS	Solução tampão de fosfato
PEC	Complexo polieletrólítico
RVL	Região viscoelástica linear
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SGF	Fluído gástrico simulado
TMC	Cloreto de N,N,N-trimetilquitosana
TN	Tanfloc
UEM	Universidade Estadual de Maringá
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS)
$\alpha$ -MEM	$\alpha$ -minimmum essential médium

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO.....	16
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>17</b>
3.1 SCAFFOLDS.....	17
3.2 GELATINA.....	18
3.3 TANINOS.....	21
3.4 DERIVADO AMINO-FUNCIONALIZADO DE TANINOS CONDENSADOS .....	23
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1 MATERIAIS .....	24
4.2 MÉTODOS.....	25
4.2.1 Purificação do tanfloc e determinação do rendimento.....	25
4.2.2 Preparo dos hidrogéis GE/TN .....	25
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO TANFLOC PURIFICADO.....	26
4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (SEM) acoplado com energia dispersiva de raios-X (EDS).....	26
4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) .....	27
4.3.3 Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X .....	27
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS GE/TN .....	27
4.4.1 Determinação da temperatura de gelificação e reologia oscilatória.....	27
4.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho.....	28
4.4.3 Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X.....	28
4.4.4 Microscopia eletrônica de varredura (SEM).....	29
4.5 PROPRIEDADES DOS HIDROGÉIS GE/TN.....	29
4.5.1 Grau de intumescimento.....	29
4.5.2 Ensaio de disintegração <i>in vitro</i> dos hidrogéis.....	30
4.6 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS HIDROGÉIS GE/TN .....	30
4.6.1 Atividade antimicrobiana.....	30
4.6.2 Cultura de células tronco mesenquimais de tecido ósseo (BMSCs).....	31
4.6.2.1 Extração de células tronco mesenquimais.....	31
4.6.2.2 Ensaio de viabilidade celular (citotoxicidade) via método AlamarBlue.....	32
4.6.2.3 Ensaios de adesão e proliferação celular.....	33
4.6.2.3.1 Via imagens de fluorescência.....	33
4.6.2.3.1 Via microscopia eletrônica de varredura.....	33
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
5.1 RENDIMENTO DE RETENÇÃO DO TANFLOC NA MEMBRANA DE DIALISE APÓS PURIFICAÇÃO .....	35

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADO DE TANINO AMINO-FUNCIONALIZADO .....	36
5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura e energia dispersiva de raios-X.....	36
5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) .....	38
5.2.3 Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) .....	41
5.3 OBTENÇÃO DOS HIDROGÉIS GE/TN .....	42
5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS GE/TN .....	45
5.4.1 Determinação da temperatura de gelificação e reologia oscilatória.....	45
5.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho.....	49
5.4.3 Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X.....	50
5.4.4 Microscopia eletrônica de varredura (SEM).....	54
5.5 PROPRIEDADES DOS HIDROGÉIS GE/TN .....	55
5.5.1 Ensaio de desintegração e intumescimento.....	55
5.6 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS HIDROGÉIS GE/TN.....	56
6.6.1 Atividade antimicrobiana.....	56
5.6.2 Citocompatibilidade dos hidrogéis GE/TN.....	60
5.6.3 Adesão e proliferação de células.....	62
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Biomateriais podem ser formados a partir de materiais metálicos, compósitos, materiais poliméricos e outros **(KULINETS, 2015)**. Dentre esses, destacam-se os hidrogéis, que são essencialmente formados por redes poliméricas reticuladas. Estas redes poliméricas podem reter em suas estruturas uma quantidade significativa de água (ou fluidos biológicos) e, ao mesmo tempo intumescerem no meio onde estão sendo aplicados sem apresentar dissolução de suas matrizes. Esta propriedade está associada à hidrofiliabilidade da matriz do hidrogel. Sendo assim, a alta estabilidade, bem como, a existência de poros interconectados na superfície do hidrogel estão entre as propriedades mais interessantes dos hidrogéis aplicados na área biomédica. Assim, o hidrogel pode mimetizar as funções da membrana extracelular (ECM) de tecidos biológicos **(WANG, TURHAN e GUNASEKARAN, 2004)**, pois a ECM possui funções específicas que governam as chamadas “decisões celulares” **(FACCHI et al., 2017a)**.

Os hidrogéis podem ser classificados como materiais químicos e físicos. Assim sendo, existem os hidrogéis reversíveis ou físicos que são formados como resultado de interações iônicas e interações intermoleculares entre os segmentos de cadeia dos polímeros que compõem a estrutura do hidrogel **(ALMEIDA, 2010)**. Estes hidrogéis podem ou não se desintegrar quando submetidos à meios, onde a temperatura, pH e força iônica são alterados **(HOFFMAN, 2012)**. Os hidrogéis físicos irreversíveis são aqueles que possuem elevada estabilidade, pois dependendo do grau de associação dos componentes poliméricos, os materiais não são dissolvidos em meio aquoso **(MARTINS et al., 2018b)**. Por outro lado, os hidrogéis essencialmente permanentes ou químicos, são formados por estruturas resultantes de ligações covalentes, não sendo possível a sua dissolução em meio aquoso **(HOFFMAN, 2012)**. Porém, ocorrem exceções, pois o hidrogel químico de poli(álcool vinílico) reticulado com glutaraldeído pode ser desfeito caso o material seja alocado em solução de fluido gástrico simulado (pH 1,2) **(DE SOUZA COSTA-JÚNIOR, PEREIRA e MANSUR, 2009)** O excesso de íons  $H_3O^+$  desloca o equilíbrio no sentido dos reagentes, favorecendo a reação inversa de formação do hidrogel. A Fig. 1 apresenta estruturas hipotéticas de um hidrogel químico e um hidrogel físico.

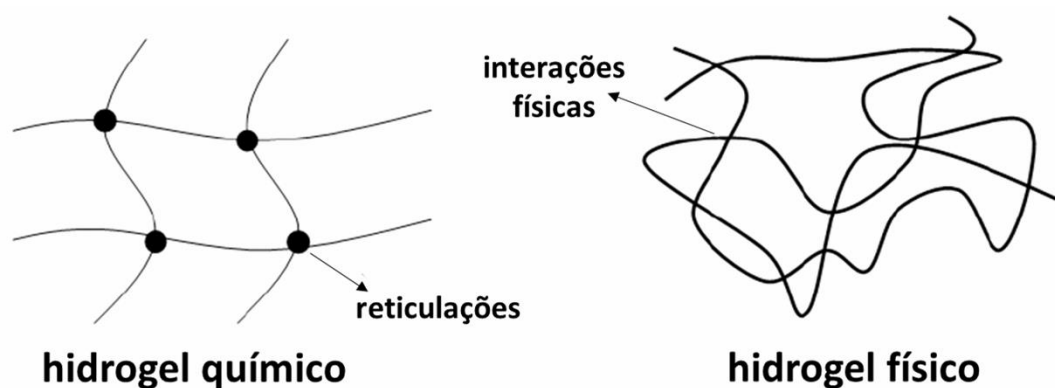


Figura 1 – Estruturas químicas hipotéticas de um hidrogel químico e um hidrogel físico.  
Fonte: Adaptado de Aouada (2009).

Devido às características singulares (capacidade de reter líquidos, hidrofiliabilidade, porosidade e outras), os hidrogéis são materiais atrativos para aplicações biomédicas. Dentre as principais características estão a citocompatibilidade, propriedade que ocorre devido, essencialmente, ao alto teor de água na estrutura do hidrogel e a presença de materiais de fontes naturais na composição estrutural dos hidrogéis (tais como, proteínas, polissacarídeos e outros). Quando intumescido, a estrutura de um hidrogel é constituída por um alto teor de água ( $\geq 90\%$  em peso), assemelhando-se ao corpo humano. Outra característica interessante é a sua natureza flexível, que minimiza atritos e danos à tecidos circundantes em possíveis aplicações. Por último, podemos destacar a excelente permeabilidade e porosidade dos hidrogéis que favorecem a difusão de nutrientes, mantendo viável a sobrevivência e o crescimento de células (**HOARE e KOHANE, 2008; THIELE et al., 2014**).

Geralmente, a maior limitação dos hidrogéis é a baixa resistência mecânica. No entanto, dependendo da composição da matriz, esta limitação pode ser superada. Hidrogéis a base de poli(álcool vinílico), policaprolactona, polióxido de etileno, colágeno, gelatina (GE) e outros) podem possuir propriedades mecânicas desejáveis (**ZHU e MARCHANT, 2011**). Além disso, por meio da associação dos hidrogéis com materiais inorgânicos, pode-se obter compósitos com propriedades mecânicas melhoradas (**CUI et al., 2014; FUKAE et al., 2011; JEJURIKAR et al., 2012**). Por exemplo, para aplicação tópica (na pele humana), deseja-se que os materiais hidrogéis (membranas) aplicados como cicatrizantes de ferimentos na pele apresentem resistência à tração na faixa de 5 a 30 MPa, pois dependendo da



orientação e do local, a pele humana possui resistência à tração nessa faixa citada (5 a 30 MPa) (**EDWARDS e MARKS, 1995**). Assim, para um hidrogel ser efetivo e promover cicatrização e regeneração da pele humana, o mesmo deve mimetizar propriedades do tecido no qual ele está sendo aplicado.

Devido à capacidade de simular a natureza da maioria dos tecidos moles, os hidrogéis são biomateriais altamente atraentes para o desenvolvimento de estruturas tridimensionais que mimetizam as funções da ECM (**NASCIMENTO et al., 2016**). Dados na literatura reportam uma ampla série de trabalhos sobre hidrogéis, destinados para regeneração e reparação tecidual de diferentes tecidos, desde o tecido ósseo até tecidos moles (músculo, cartilagem, vertebra, pele, e outros) (**FLOREN et al., 2016; SASAKI, MURAKAMI e SUZUKI, 2016; SIVASHANMUGAM et al., 2015; VO et al., 2016**).

A GE é uma proteína animal natural, biodegradável, produzida a partir da hidrólise do colágeno via catálise ácida ou alcalina, sendo amplamente utilizada em formulações para aplicação na área de cosméticos, farmacêutica e alimentícia (**SAHOO et al., 2015**). Sendo um derivado do colágeno, a GE exibe excelente citocompatibilidade, atraindo atenção de pesquisadores que, tem buscado desenvolver hidrogéis a base de GE para aplicações biomédicas, especialmente no campo de engenharia de tecidos (**VARGHESE, CHELLAPPA e FATHIMA, 2014**).

Os taninos são materiais polifenólicos que ocorrem amplamente nas plantas. Os taninos são classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados (**OĆWIEJA, ADAMCZYK e MORGA, 2015**). Os hidrolisáveis são formados basicamente por moléculas de ácido gálico ligadas em unidades de açúcares (glicose). Já os condensados tem como base estrutural as moléculas flavan-3-ol (**FACCHI et al., 2017b**). O tanfloc (TN) é um derivado catiônico amino-funcionalizado obtido pela reação de taninos condensados com ácido fórmico e cloreto de amônio (**MANGRICH et al., 2014**). O TN apresenta as mesmas propriedades dos taninos condensados, tais como solubilidade, atividade antioxidante e potencial quelante sobre metais tóxicos (**BELTRÁN-HEREDIA e SÁNCHEZ-MARTÍN, 2009**). Os taninos condensados e seu derivado TN exibem propriedades de biodegradabilidade, citocompatibilidade e atividade bactericida (**FACCHI et al., 2017b**). Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou pela primeira vez que que hidrogéis de alginato/TN possuem potencial aplicação na área biomédica (**FACCHI et al., 2017b**).

Assim, este estudo tem como objetivo associar pela primeira vez o TN e a GE para produzir hidrogéis com grande potencial de aplicação na área de engenharia de tecidos. Os hidrogéis poderão ser aplicados como suportes porosos (*scaffolds*) usados na regeneração e cicatrização de tecidos. Esses materiais *scaffolds* podem apresentar atividade antimicrobiana. Essa propriedade será também avaliada. Não há relatos na literatura de trabalhos abordando a mistura do TN com a GE.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Obter e caracterizar hidrogéis *scaffolds* de gelatina (GE) e um derivado amino-funcionalizado (TN) sintetizado a partir de taninos condensados.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter blendas poliméricas de gelatina/tanino amino-funcionalizado (Blendas GE/TN);
- Obter hidrogéis das blendas GE/TN;
- Caracterizar os materiais por meio de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), medidas reológicas, espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) e microscopia eletrônica de varredura (SEM);
- Realizar estudos de estabilidade dos hidrogéis;
- Avaliar as atividades antimicrobiana e citocompatibilidade dos hidrogéis;
- Avaliar o potencial do hidrogel como material *scaffold*.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 SCAFFOLDS

A engenharia de tecidos e medicina regenerativa é um campo multidisciplinar de pesquisa que emprega princípios de química, biologia e engenharia para estudar a interação de tecidos vivos com biomateriais. Neste caso, almeja-se que os biomateriais atuem no crescimento, desenvolvimento e regeneração de tecidos ou órgãos danificados (**PINA, OLIVEIRA e REIS, 2015**). Ou seja, biomateriais devem facilitar a criação de substitutos biológicos para reparar ou repor órgãos ou tecidos prejudicados. Uma das abordagens mais promissoras nessa direção são as matrizes *scaffolds*; biomateriais que atuam como suportes temporários para promoverem fixação e ancoragem (adesão de células), bem como, proliferação e crescimento celular (**OKAMOTO e JOHN, 2013**).

Os *scaffolds* devem ter superfícies e microestruturas adequadas para proporcionar crescimento celular e fornecer suporte mecânico durante formação de novos tecidos. Durante formação e regeneração do novo tecido, o ideal é que o *scaffold* degrade e seja metabolizado no corpo (**ROCHA et al., 2012**). A porosidade, o tamanho de poros e a interconectividade entre os poros são características morfológicas dos *scaffolds* que influenciam diretamente no estabelecimento de interações célula-célula, promovendo eventos de adesão de células, proliferação, diferenciação celular e outros. Uma elevada porosidade é desejável para maximizar a possível acomodação da massa celular e infiltração vascular; no entanto, poros com diâmetros grandes (>500 µm), geralmente comprometem as propriedades mecânicas do material *scaffold* (**KURTIS KASPER F. e MIKOS, 2013**). Poros grandes e redes interconectadas são essenciais para a nutrição, proliferação e migração das células para a vascularização e formação de novos tecidos (**LOH e CHOONG, 2013**).

A escolha do material a ser empregado como suporte *scaffold* na engenharia tecidual depende, primeiramente, do tipo de tecido a ser reconstruído e fatores relacionados ao local de aplicação (**MURUGAN e RAMAKRISHNA, 2007; SABIR, XU e LI, 2009**). No geral, cerâmicas, compósitos e hidrogéis a base de GE e colágeno são amplamente usados como *scaffolds* voltados para reconstrução de tecidos duros (tecido ósseo), enquanto que, hidrogéis a base de polissacarídeos são empregados

na reconstrução de tecidos moles (pele, tendão, ligamento, vasos sanguíneos e válvulas cardíacas) (**LI e GUAN, 2011; MURUGAN e RAMAKRISHNA, 2007; SABIR, XU e LI, 2009**).

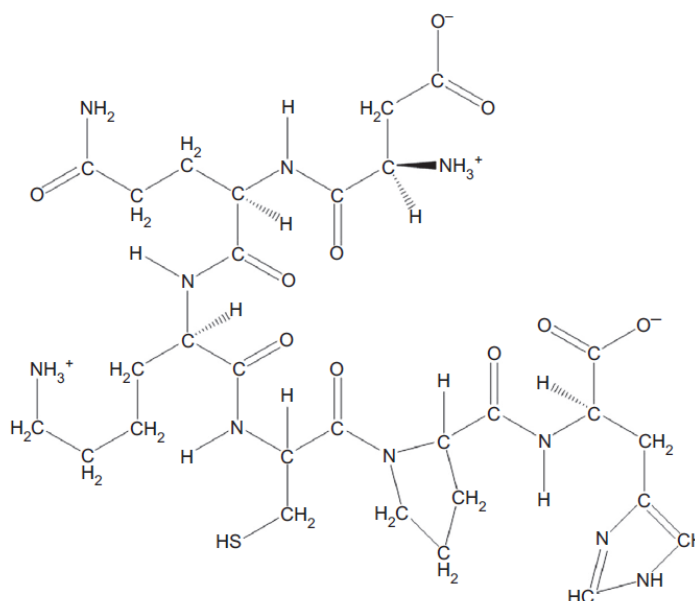
Hidrogel é um material adequado para a fabricação de um suporte poroso, pois sua estrutura é similar à matriz extracelular de muitos tecidos e, ainda pode ser utilizado para a liberação de moléculas bioativas (**DRURY e MOONEY, 2003**). A obtenção de um material poroso, pode ser viabilizada pelo congelamento da matriz polimérica, seguida por liofilização do hidrogel (**WU e MEREDITH, 2014**). Nesse processo, a remoção de água da matriz pode gerar uma grande quantidade de poros interconectados. Além disso, outros fatores também contribuem para a formação de poros interconectados, fatores tais como: metodologia de preparo dos hidrogéis, processo de gelificação e congelamento da matriz, bem como suas características físico-químicas dos componentes do sistema polimérico (**LIU et al., 2016**).

Os hidrogéis utilizados para a obtenção de *scaffolds* podem ter origem natural ou sintética. Os polímeros sintéticos incluem: poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico-co-ácido glicólico), e policaprolactona (**OKAMOTO e JOHN, 2013**). Já entre os polímeros de origem natural incluem: polissacarídeos (por exemplo, celulose, quitina, quitosana) e proteínas (por exemplo, colágeno, GE, seda, elastina) (**PINA, OLIVEIRA e REIS, 2015**). Um dos biopolímeros mais promissores para a formação de *scaffolds* é a GE (**JIANG et al., 2014**). De acordo com a literatura, *scaffolds* a base de GE melhoram significativamente a infiltração, adesão, disseminação e proliferação de células nos suportes porosos resultantes (**SU e WANG, 2015**). Diversos trabalhos tem abordado estudos de *scaffolds* de GE e polímeros naturais (fibroína de seda, celulose bacteriana, alginato e outros) produzidos por congelamento da matriz polimérica, seguido do processo de liofilização (**KIRDPONPATTARA, PHISALAPHONG e KONGRUANG, 2017; KITI et al., 2018; ROSELLINI et al., 2018**).

### 3.2 GELATINA

A GE é um biopolímero natural derivada do colágeno, sendo amplamente utilizada na área médica devido à sua excelente citocompatibilidade, disponibilidade e baixo custo de processamento (**MIGUEZ-PACHECO, MISRA e BOCCACCINI,**

**2014).** A GE é obtida por hidrólise ácida (GE tipo A) ou hidrólise alcalina (GE tipo B) do colágeno nativo que é encontrado na pele, cartilagem e ossos de animais (**ALIHOSSEINI, 2016**). A GE tipo A tem ponto isoelétrico (PI) na faixa de pH entre 7,0 a 9,0 e a GE tipo B tem PI na faixa de pH entre 4,8 a 5,1 (**SMITH, MOXON e MORRIS, 2016**). Portanto, a GE possui caráter anfótero, ou seja, a GE tipo A apresentará excesso de densidade de carga positiva em soluções com pHs abaixo de 7,0, enquanto a GE tipo B possuirá excesso de densidade de carga positiva apenas em condições de pHs abaixo de 4,8 (**VAN VLIERBERGHE et al., 2014**). Reporta-se que a GE (Fig. 2) é formada por 18 aminoácidos, sendo a glicina, prolina e hidroxiprolina os três aminoácidos predominantes na estrutura (**ALIHOSSEINI, 2016**). Os tipos de GE se diferem entre si, pela predominância de glicina na GE tipo A e alanina na GE tipo B. A Tabela 1 retrata a composição química da GE, bem como os valores de pK<sub>a</sub> dos aminoácidos que compõem a cadeia lateral da GE. Este estudo irá retratar o uso da GE tipo B para produção de hidrogéis físicos.



**Figura 2 – Estrutura química geral da GE.**  
**Fonte: Alihosseini (2016).**

**Tabela 1** – Composição química e valores de pK<sub>a</sub> dos aminoácidos constituintes da GE.

Aminoácido	GE (mmol/g)*	pK <sub>a</sub>
<b>Grupo aniônico</b>		
Ácido aspártico	0,50 (0,32)	4-4,5
Ácido glutâmico	0,78 (0,52)	4,5
Tirosina	0,011-0,044	10
α-COOH	0,011	3,6
<b>Grupo catiônico</b>		
Lisina	0,30	10-10,4
Hidroxilisina	0,054	9,5
Arginina	0,53	>12
Histidina	0,044	6,5-7
α-NH <sub>2</sub>	0,011	7,8

\*Os valores em parênteses (quando ocorrem) se referem à dados da gelatina tipo A (**MARK, 2004**). Nos demais casos, todos os dados são referentes à ambas formas da GE.

Hidrogéis de GE podem apresentar propriedade termossensível. Este efeito depende da estrutura da GE e, principalmente da presença de grupos polares em sua matriz que são capazes de estabelecerem interações de ligação de hidrogênio no processo de gelificação de hidrogéis a base de GE (**DILLE, HATTREM e DRAGET, 2018**). Os hidrogéis físicos de GE contêm ligações cruzadas formadas pelo retorno parcial a configuração “ordenada” de tripla hélice similar as que ocorrem na estrutura tridimensional do colágeno” (**PANG et al., 2014**).

Hidrogéis contendo GE são promissores para serem aplicados no tratamento de feridas e podem atuar como suportes *scaffolds* no campo de engenharia de tecidos, devido à GE possuir propriedades desejáveis como citocompatibilidade, propriedades mecânicas apropriadas, e mucoadesividade (**KOSHY et al., 2016**). No entanto, hidrogéis físicos de GE podem apresentar desvantagens. Materiais físicos de GE podem não suportar a temperatura normal do corpo humano de 37°C e degradar-se completamente, uma vez que estes materiais possuem temperaturas de transição sol-gel próximos a 37°C. A fim de melhorar as propriedades mecânicas e térmicas de hidrogéis a base de GE, agentes químicos reticulantes, tais como o glutaraldeído e a

epicloridrina são geralmente usados para dar estabilidade aos hidrogéis formados **(HAEMA et al., 2014)**. Hidrogéis químicos de GE são preparados facilmente na presença de glutaraldeído; um agente químico reticulante suscetível ao ataque nucleofílico de grupos –OH e –NH<sub>2</sub> **(GULREZ, AL-ASSAF e PHILLIPS, 2011)**. No entanto, a reticulação química também leva à diminuição ou inibe a biodegradabilidade da GE e pode induzir citotoxicidade no material **(JIANG, REDDY e YANG, 2010)**. Por isso, quando se trata de aplicações biomédicas, os hidrogéis físicos, comumente denominados de complexos polieletrólíticos (PECs) possuem vantagens em relação aos hidrogéis químicos. PECs são preparados sem o uso de agentes químicos de reticulação e, podem ser obtidos via metodologias mais simples (com baixo número de etapas no processo) **(YANG, TAN e ZHAO, 2014)**.

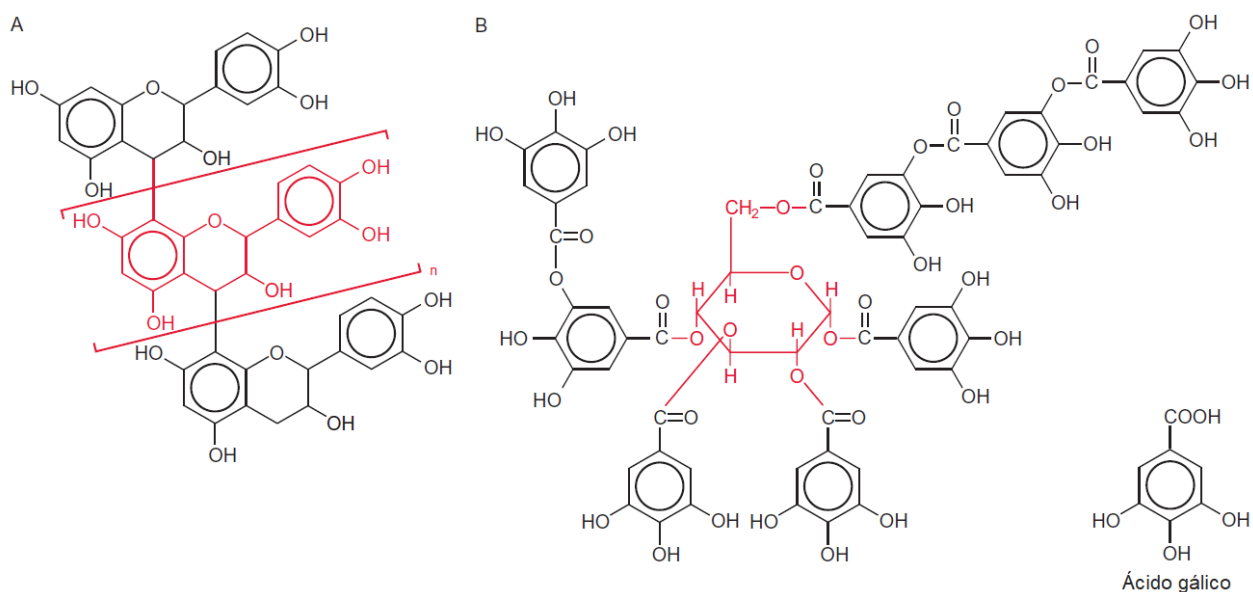
Hidrogéis físicos de GE e quitosana tem sido aplicados como sistemas de curativos na área de regeneração e reparação tecidual **(CAI et al., 2016; NG, YEONG e NAING, 2016)**. **Sultana et al., (2018)** fabricaram *scaffolds* de GE com diferentes tamanhos de poros (100 a 450 µm), ajustando a concentração de GE (3,75 e 5,0% m/v) em soluções preparadas na presença de ácido acético 2,0% v/v. Os hidrogéis foram obtidos via processo de congelamento, seguido de liofilização. Os resultados mostraram que quando a concentração da solução de GE foi alterada de 3,75% m/v para 5,0% m/v, a absorção de água do *scaffold* diminuiu em 104%. A hidrofiliicidade influencia significativamente na capacidade de um hidrogel atuar como matriz *scaffold*. Deve-se haver um balanço hidrofílico-hidrofóbico para que o *scaffold* estabeleça interações efetivas com células **(MARTINS et al., 2018b)**.

### 3.3 TANINOS

Depois da celulose, hemicelulose e lignina, os taninos representam o quarto constituinte vegetal mais abundante do planeta **(AGUILAR et al., 2007)**. Os taninos atuam no mecanismo de defesa dos vegetais contra microrganismos, herbívoros, pássaros e contra condições ambientais hostis. Taninos possuem atividade antimicrobiana, devido ao grande conteúdo de grupos fenólicos ácidos em suas estruturas **(MAILOA et al., 2014)**. Os mecanismos pelos quais eles exercem atividade antimicrobiana estão relacionados à inibição de enzimas microbianas extracelulares, privação dos substratos necessários para o crescimento microbiano e inibição da

fosforilação oxidativa que, afeta o metabolismo microbiano (**GUIL-GUERRERO et al., 2016**). Portanto, os taninos estão associados à resistência de vegetais contra o ataque de patógenos.

Os taninos são polímeros polifenólicos de peso molecular relativamente alto com a capacidade de formar PECs principalmente com proteínas devido à presença de um grande número de grupos fenólicos em suas estruturas (**PATRA e SAXENA, 2010**). Eles são classificados em dois grupos: condensados (Fig. 3A) e hidrolisados (Fig. 3B). Os taninos condensados são mais abundantes e incluem oligômeros e polímeros de unidades flavonoides (unidades de favan-3-ol) (Fig. 3A). Os taninos hidrolisáveis são frequentemente moléculas a base de D-glicose como núcleo central (Fig. 3B). Os grupamentos hidroxila deste carboidrato estão parcialmente ou totalmente esterificados com moléculas de ácido gálico (**HELDT e PIECHULLA, 2011; MARTINS et al., 2018a**).



**Figura 3 – (A) Estrutura química de taninos condensados. (B) Estrutura química de taninos hidrolisáveis. Os grupos hidroxila da D-glicose estão esterificados com ácidos gálicos. Fonte: Adaptado de Heldt e Piechulla (2011).**

Devido à presença de grupos hidroxila, esses compostos possuem habilidades para formarem complexos com íons metálicos, proteínas e polissacarídeos (**AL-JABER, AWAAD e MOSES, 2011; ROMANI et al., 2006**). Os complexos formados entre taninos condensados com proteínas e polissacarídeos podem ser PECs reversíveis ou irreversíveis. PECs são formados pelo estabelecimento de interações



eletrostáticas, íon-dipolo, e interações intermoleculares entre os segmentos de cadeias dos materiais associados (**TENTOR et al., 2017**). PECs convencionais são obtidos pela precipitação de polieletrólitos em solução aquosa. Neste caso, e quase sempre, os PECs apresentam estruturas frágeis e quebradiças sem homogeneidade estrutural (**MARTINS et al., 2015b**). Há também formação de PECs por meio de blendas poliméricas estáveis obtidas em temperaturas elevadas. Blendas de quitosana/pectina preparadas a 65 °C são resfriadas para produzir PECs termossensíveis (**TENTOR et al., 2017**). Dependendo de condições específicas de preparo, complexos a base de taninos podem ser irreversíveis devido ao estabelecimento de interações efetivas entre as macromoléculas combinadas (**FACCHI et al., 2017b**).

#### 3.4 DERIVADO AMINO-FUNCIONALIZADO DE TANINOS CONDENSADOS

O derivado amino-funcionalizado comumente denominado de tanfloc (TN) é um polímero catiônico, pois possui grupos amino ( $pK_a = 6,0$ ) por cada unidade repetitiva de sua estrutura polimérica, conferindo-lhe excesso de densidade de carga positiva em condições de pH inferiores a 6,0 (Fig. 4). O TN é obtido a partir de taninos naturais condensados, extraído da *Acacia mearnsii*, popularmente chamada de Acácia Negra. O TN é preparado pela Empresa TANAC S.A (Montenegro-RS, Brasil) e comercializado devido à sua propriedade coagulante e floculante. O TN é amplamente utilizado como agente de coagulação-floculação no tratamento de águas residuais e efluentes e, têm substituído agentes químicos convencionais (sais de alumínio ou ferro) de floculação/coagulação. A síntese do TN ocorre por meio da reação de taninos condensados na presença de formaldeído e cloreto de amônio ou uma amina primária, de acordo com o mecanismo de catálise ácida proposta por Mannich (**MANGRICH et al., 2014**). A estrutura do TN é afetada por processos de hidrólise-hidratação, principalmente em condições alcalinas extremas ( $pH > 9,0$ ) (**FACCHI et al., 2017b**).

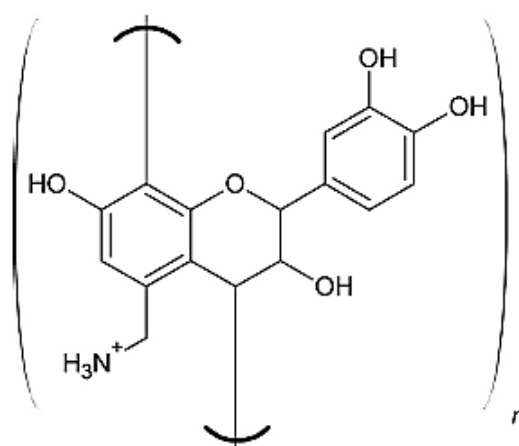


Figura 4 – Estrutura química do TN (cátion orgânico). Reproduzido de Martins et al., 2018 com permissão da Elsevier.

Segundo Mangrich et al. (2014), o TN processado pela TANAC S.A pode chegar a ter massa molar média de até 600 kDa e apresenta solubilidade em soluções aquosas de ácidos diluídos. O TN e taninos condensados são biodegradáveis, citocompatíveis e possuem atividade antioxidante e antimicrobiana. Portanto, materiais a base de taninos e TN podem ser atrativos para o desenvolvimento de hidrogéis. Já foi relatado por nosso grupo de pesquisa que o TN possui atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (FACCHI et al., 2017b).

Recentemente, Martins et al., (2018a) desenvolveram pela primeira vez nanofibras de policaprolactona/TN para a obtenção de membranas *scaffolds*. As membranas apresentaram atividade antimicrobiana, citocompatibilidade e promoveram adesão e proliferação de células-tronco humanas do tecido adiposo (ADSC) depois de 7 dias de cultura celular. Portanto, neste trabalho, pela primeira vez a GE será associada ao TN para obtenção de PECs *scaffolds* estáveis e termossensíveis. Essas matrizes podem apresentar ainda atividade antimicrobiana, além de serem produzidas a partir de materiais de baixo custo.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

O polímero catiônico amino-funcionalizado, denominado de tanfloc-SG (TN) foi gentilmente doado pela TANAC S.A (Montenegro-RS, Brasil). Membrana de celulose

(12 kDa) para a diálise foi adquirida da Sigma-Aldrich (Brasil). Gelatina do “tipo B” extraída de osso bovino, foi doada pela empresa Rousselot Gelatinas do Brasil S.A (Amparo-SP, Brasil).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Purificação do tanfloc e determinação do rendimento

O TN foi purificado através da diálise de suas soluções aquosas. Para o processo de diálise, 50 mL de uma solução de TN (5,0% m/v ou 50 g L<sup>-1</sup>) foi filtrada e, em seguida, colocada em uma membrana de celulose (12 kDa) para diálise. O sistema foi imerso em um béquer contendo 1,6 L de água deionizada (pH 5,5) e vedado com parafilme. O processo foi realizado durante 5 dias, efetuando-se a troca da água duas vezes ao dia. Após este período, a solução de TN dialisada (50 mL) foi removida da membrana de celulose, congelada e liofilizada (-50 °C, 24 h). Então, o material foi caracterizado, bem como, o rendimento do processo foi estimado. Para isso, foi considerado a massa de TN inicial (2,5 g) usada no preparo da solução que foi dialisada e a massa de TN presente no material dialisado e liofilizado (massa final de TN). Assim, a concentração (4,6 g L<sup>-1</sup>) de TN no volume final da solução dialisada (aproximadamente 50 mL) foi determinada, por meio da massa de TN que ficou retida na membrana de diálise após 5 dias e o volume de líquido retido na membrana. Este processo foi realizado em triplicata ( $n = 3$ ).

### 4.2.2 Preparo dos hidrogéis GE/TN

Primeiramente, soluções GE foram preparadas em água deionizada nas concentrações 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, e 5,0% m/v, sob agitação magnética a 50°C durante 15 min. Blendas GE/TN (v/v) foram preparadas nas proporções 30/70, 50/50, 70/30 e 90/10, respectivamente. Para o preparo das blendas, após diálise, alíquotas da solução de TN (4,6 g L<sup>-1</sup> a 50°C) foram lentamente gotejadas sobre as soluções de GE até um volume final de 6,0 mL, mantendo o sistema em agitação magnética a 50°C. Nesse caso, a solução de TN dialisada não foi congelada e, nem liofilizada. A mesma foi utilizada logo após ser dialisada em água deionizada (aproximadamente

pH 6,0). Então, as blendas GE/TN foram mantidas em agitação magnética por mais 15 min. Por fim, misturas uniformes GE/TN (50°C) foram alocadas na geladeira a 4°C (24 h) para formação dos hidrogéis termossensíveis a base de GE/TN. Os materiais foram congelados e liofilizados (48 h). A Tabela 2 descreve com detalhe todas as condições experimentais usadas para o preparo dos hidrogéis GE/TN.

**Tabela 2** – Condições experimentais utilizadas no preparo dos hidrogéis GE/TN a partir de blendas GE/TN com volume final de 6,0 mL.

Condição	Solução GE% (m/v)	GE (mL)	GE/TN (v/v)	GE/TN (m/m)
1	1	1,8	30/70*	48,2/51,8
2	1	3,0	50/50*	68,5/31,5
3	1	4,2	70/30	83,5/16,5
4	2	1,8	30/70*	63,9/36,1
5	2	3,0	50/50	81,3/18,7
6	2	4,2	70/30	91/9
7	2	5,4	90/10	97,5/2,5
8	3	1,8	30/70*	73,6/26,4
9	3	3,0	50/50	86,7/13,3
10	3	4,2	70/30	93,8/6,2
11	3	5,4	90/10	98,3/1,7
12	4	1,8	30/70*	78,8/21,2
13	4	3,0	50/50	89,7/10,3
14	4	4,2	70/30	95,3/4,7
15	4	5,4	90/10	98,7/1,3
16	5	5,4	90/10**	99/1

\*Condições em que não foram formados hidrogéis GE/TN.

\*\*Condição em que a blenda GE/TN não apresentou estabilidade. Ocorre precipitação da GE na presença de TN.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DO TANFLOC PURIFICADO

#### 4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (SEM) acoplado com energia dispersiva de raios-X (EDS)

A morfologia do TN foi estudada por análise de microscopia eletrônica de varredura (SEM). Amostras de TN antes e depois da purificação (amostra após ser

dialisada, congelada e liofilizada) foram revestidas por uma fina camada de ouro (10 nm), antes de processar as imagens. As imagens foram adquiridas por meio da aplicação de um feixe de elétrons acelerados com voltagem de 5 kV, usando um equipamento SEM JSM-6500F (Japão). Também, foram obtidos espectros EDS do TN não purificado e purificado. Esta análise foi realizada na Colorado State University (CSU), USA.

#### 4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Espectros de FTIR (processado a partir de pastilhas de KBr) do TN não purificado e purificado foram obtidos utilizando um espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (Cary 630), na faixa de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.3.3 Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X

A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X é uma técnica utilizada para caracterizar superfícies de sólidos, pois fornece dados sobre a composição atômica da superfície. Os espectros XPS foram obtidos por meio de um espectrômetro PhiElectronics 5800 (modelo Chanhassen MN), com auxílio de uma fonte Al  $K\alpha$  monocromática de raios-X ( $h\nu = 1486,6 \text{ eV}$ ), um analisador hemisférico e um detector multicanal. O ajuste dos espectros de alta resolução foi realizado por meio do software Origin 8.5, usando função gaussiana (ROMERO et al., 2015). Esta análise foi realizada na Colorado State University (CSU), USA.

### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS GE/TN

#### 4.4.1 Determinação da temperatura de gelificação e reologia oscilatória

A temperatura de transição sólido-gel ( $T_{\text{sol-gel}}$ ) dos sistemas foram determinadas utilizando um reômetro de tensão e gradiente controlados MARS II (Haake®), no modo oscilatório, rampa de temperatura, com geometria cone-placa paralelas com 35 mm de diâmetro, separadas por uma distância fixa de 0,052 mm. Similarmente, cada amostra foi cuidadosamente aplicada à placa inferior do reômetro, assegurando o

mínimo cisalhamento da formulação e permitindo um tempo de repouso de 1,0 min antes de cada determinação. Inicialmente, foi realizada a determinação da região viscoelástica linear (RVL) de cada formulação nas temperaturas de 5°C e 60°C. Caracteriza-se como RVL, a região onde a tensão e a deformação são diretamente proporcionais e o módulo elástico ou de armazenamento ( $G'$ ) permanece constante. Em seguida, a análise de varredura da temperatura foi conduzida na faixa de 5 a 60 °C, com gradual aumento de 10 °C  $\text{min}^{-1}$  na temperatura, seguindo a aplicação de uma tensão constante a frequência de 1,0 Hz. O módulo elástico ( $G'$ ), o módulo viscoso e de perda ( $G''$ ), foram determinadas utilizando o programa RheoWin 4.10.0000 (Haake®). As análises foram realizadas em triplicata para cada formulação. Gráficos do módulo de armazenamento ( $G'$ ) em função da temperatura foram construídos. A primeira derivada da curva de  $G'$  vs. Temperatura, possibilitou a obtenção das temperaturas  $T_{\text{sol-gel}}$ , por meio da análise da temperatura no ponto de inflexão.

Adicionalmente, a análise oscilatória dos sistemas foi realizada no mesmo reômetro e geometria descritos anteriormente na temperatura de  $37 \pm 0.1$  °C. Após a determinação da RVL de cada amostra, foi realizada a varredura de frequência de 0,1 a 10,0 Hz em uma tensão constante. Três replicatas foram analisadas para cada amostra (**BRUSCHI et al., 2007; DE SOUZA FERREIRA et al., 2015, 2017**). As análises foram feitas na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

#### 4.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho

Os hidrogéis foram caracterizados por meio de FTIR-ATR utilizando um espectrofotômetro (Shimadzu Scientific, modelo 8300 Japan). Os espectros foram obtidos na faixa de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , após acumulação de 64 varreduras. Esta análise foi realizada na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

#### 4.4.3 Espectroscopia de fotoelétrons induzida por raios-X (XPS)

A metodologia utilizada foi a mesma descrita na seção 4.3.3. Esta análise também foi realizada na Colorado State University (CSU), USA.

#### 4.4.4 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Antes da aquisição das imagens, as amostras (hidrogéis termossensíveis) foram congelados e liofilizados (48 h). Então, imagens SEM foram processadas a partir de amostras fraturadas (seções transversais). Para obtenção das imagens SEM, as amostras foram revestidas (10 nm) com liga de paládio-ouro. Então, as imagens foram processadas em um equipamento SEM JSM-6500F (Japão) com aceleração de 5 kV. As análises foram realizadas na Colorado State University (CSU), USA.

### 4.5 PROPRIEDADES DOS HIDROGÉIS GE/TN

#### 4.5.1 Grau de intumescimento

O grau de intumescimento (G%) dos hidrogéis GE/TN foi obtido em SGF (pH 1,2) e PBS (pH 7,4) a 37 °C. Este experimento foi realizado registrando-se a massa inicial seca ( $M_i$ ) dos hidrogéis congelados e liofilizados (aproximadamente 0,10 g) antes do teste e a massa final ( $M_f$ ) dos hidrogéis após o contato com as respectivas soluções por 24 h. O experimento foi realizado em uma incubadora Shaker (Thoth 6430) com agitação de 100 rpm. O G% foi determinado por meio da Eq. 1

$$G(\%) = \left( \frac{M_f - M_i}{M_i} \right) \times 100 \quad (1)$$

onde G% é o grau de intumescimento dos hidrogéis,  $M_i$  a massa inicial seca e  $M_f$  a massa final dos hidrogéis intumescidos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata ( $n = 3$ ).

Dados das soluções utilizadas:

SGF (pH= 1,2): 2,0 g de cloreto de sódio em 7,0 mL de uma solução de ácido clorídrico concentrado (37% m/v) e completou-se com água deionizada para um volume final de solução de 1000 mL (**GEROLA et al., 2016**).

PBS (pH 7,4): 82 g de cloreto de sódio, 10,5 g de fosfato de sódio e 3,55 g de fosfato de sódio monobásico em 1000 mL de água destilada.

#### 4.5.2 Ensaio de disintegração *in vitro* dos hidrogéis

Hidrogéis congelados e liofilizados (aproximadamente 0,10 g), tiveram a massa inicial seca ( $M_i$ ) determinadas. Os hidrogéis foram adicionados em 70 mL de solução (SGF ou PBS) e, foram mantidos a 37 °C com agitação de 100 rpm em uma incubadora Shaker (Thoth 6430). Após intervalos de tempos desejados (4 e 7 dias), os hidrogéis foram removidos das soluções SGF e PBS por meio do uso de uma peneira. Por fim, os hidrogéis foram secos em estufa a 40 °C por 24 h e a massa final dos hidrogéis secos foram determinadas. O percentual de disintegração (D%) dos hidrogéis foi avaliado por meio da Eq. 2

$$D(\%) = \left( \frac{M_i - M_f}{M_i} \right) \times 100 \quad (2)$$

onde D(%) corresponde ao percentual de disintegração dos hidrogéis,  $M_f$  a massa final dos materiais secos determinada após contato com as soluções SGF e PBS e  $M_i$  a massa inicial dos hidrogéis secos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata ( $n = 3$ ).

#### 4.6 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS HIDROGÉIS GE/TN

##### 4.6.1 Atividade antimicrobiana

O método de disco difusão em ágar foi utilizado para determinar a atividade antimicrobiana dos hidrogéis, de acordo com Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). O ensaio foi realizado a partir de cultivos recentes (incubação em overnight a 37°C) do microrganismo *E. coli* (ATCC 25922), isolado em caldo Brian Heart Infusion (BHI) (HIMEDIA). Posteriormente, suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina a 0,85% esterilizada, com turbidez semelhante a escala 0,5 de McFarland (concentração aproximada de  $1,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). Com a ajuda de “swabs” estéreis, estas suspensões foram depositadas sobre placas de Petri contendo o meio de cultura Agar Mueller Hinton (MHA) (Sigma-Aldrich), em diferentes condições de pH (pH 6,0 e 7,4). O meio de cultura já se encontra em pH 7,4, para a condição de



pH 6,0 foi adicionado alíquotas de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> até atingir o pH desejado (6,0). Sobre a superfície do meio contendo o microrganismo, foram depositados discos de 6,0 mm de diâmetro dos hidrogéis. Os testes foram realizados em triplicata ( $n = 3$ ), e as placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. Os resultados foram obtidos em termos de halo de inibição (mm) e comparados com um controle. O controle foi preparado utilizando a mesma metodologia descrita acima; porém, sobre a superfície dos meios inoculados, foram depositados discos (6,0 mm) de papel filtro (Laborclin) impregnados com os seguintes agentes antimicrobianos: gentamicina (120 µg) e ciprofloxacina (5 µg) (CLSI, 2012).

#### 4.6.2 Cultura de células tronco mesenquimais de tecido ósseo (BMSCs)

##### 4.6.2.1 Extração de células tronco mesenquimais

As BMSCs foram isoladas de ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) fornecidos por Harlan Sprague Dawley, Inc (USA). O protocolo para extração das células foi aprovado pelo comitê de ética da Colorado State University (CSU), que trata do uso de animais em experimentos. Este comitê também está em conformidade com o guia “National Institute of Health” que aborda sobre cuidados necessários que devem ser tomados com o uso de animais em laboratório. O fêmur dos animais recém mortos, bem como, o tecido mole sobre cada fêmur foi assepticamente removido. As extremidades metafisárias dos ossos foram removidas para expor a cavidade da medula óssea. Num tubo falcon de 50 mL, a medula foi repetidamente lavada com meio de cultura ( $\alpha$ -minimum essential medium;  $\alpha$ -MEM), contendo 10% de soro fetal de bovino (FBS, Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina/estreptomicina (pen/strep, Sigma-Aldrich, USA). A medula foi removida com auxílio de seringas de 10 mL com agulhas de 18 e 25 gauges. Então, as células BMSCs foram recolhidas em meio de cultura  $\alpha$ -MEM em tubo falcon de 50 mL. Após coleta, o sistema foi filtrado em filtro de nylon (70 µm) e recolhidas em um novo tubo falcon. Então, as células foram contadas em microscópio com auxílio de uma câmara de Neubauer, contendo 10 µL da suspensão contendo as BMSCs. A contagem foi realizada antes de semear as células com as amostras. Antes de semear as BMSCs com os hidrogéis, amostras secas (aproximadamente 8 × 2 mm) foram esterilizadas, adicionando as amostras em uma placa de 48 poços e incubando estas em PBS por 30 min sob exposição de irradiação

ultravioleta. Em seguida, o PBS foi removido e as BMSCs (500  $\mu$ L em suspensão) foram semeadas nas amostras a uma densidade de 1,0 milhão  $\text{mL}^{-1}$ . Esse protocolo foi realizado na Colorado State University (CSU), USA.

#### 4.6.2.2 Ensaio de viabilidade celular (citotoxicidade) via método AlamarBlue

A viabilidade celular sobre as BMSCs foi determinada pelo ensaio CellTiter-Blue® (Promega G808A, Madison, WI), de acordo com instruções do fabricante. Após esterilização, as amostras (8  $\times$  2 mm) foram incubadas com as amostras. Após 4 e 7 dias de cultura a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, 50  $\mu$ L do corante CellTiter-Blue (AlamarBlue) foram adicionados aos poços contendo as amostras semeadas com as células em meio de cultura  $\alpha$ -MEM (500  $\mu$ L). Em seguida, cada conjunto foi incubado por 4 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Assim, a absorbância do sobrenadante dos poços foi lida em leitor de microplacas (Molecular Devices Spectra Max M3, Sunnyvale, CA, USA) em 570 - 600 nm.

Os valores de porcentagem de redução do AlamarBlue (AB%) dependem da quantidade de células viáveis, ou seja, a porcentagem de redução AB% expressa a porcentagem de células viáveis (viabilidade celular) (**AL-NASIRY et al., 2007**). O valor de AB% foi corrigido, considerando os valores AB% de dois controles. Um controle contendo o meio  $\alpha$ -MEM (com a presença de células) e AlamarBlue, mas sem as amostras (hidrogéis GE/TN). Um outro experimento controle foi realizado, utilizando folhas de titânio (amostra com 8 mm de diâmetro) como controle positivo na presença de células e AlamarBlue. Para eliminar a contribuição do meio de cultura sobre os valores de AB% e, então, normalizar os resultados de viabilidade celular (%), o titânio foi escolhido como controle interno. Este foi selecionado devido à renomada citocompatibilidade e potencial biomédico para ser aplicado em implantes (**DE VITERI e FUENTES, 2013**). Os experimentos foram realizados com  $n = 5$  na Colorado State University (CSU), USA.

#### 4.6.2.3 Ensaios de adesão e proliferação celular

##### 4.6.2.3.1 Via imagens de fluorescência

A resposta das BMSCs sobre os hidrogéis GE/TN foi investigada após 4 e 7 dias de cultura em meio  $\alpha$ -MEM. A adesão e proliferação celular foram avaliadas por meio de imagens de fluorescência das células aderidas sobre a amostra, na presença do corante 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Invitrogen) para visualização do núcleo celular (**MARTINS et al., 2018b**). As imagens foram obtidas por meio de um microscópio de fluorescência (Zeiss, USA). Após 4 e 7 dias de cultura, o meio  $\alpha$ -MEM foi aspirado das placas e as amostras foram suavemente lavadas (2 vezes) em PBS antes de serem transferidas para uma nova placa de 48 poços. Este processo removeu as células não aderidas à superfície dos hidrogéis. As células foram fixadas em uma solução de formaldeído a 3,7% v/v em água deionizada por 15 min em temperatura ambiente. Então, a solução de formaldeído foi removida e os hidrogéis lavados três vezes com PBS (cada etapa de lavagem durou 5 min). As células foram permeabilizadas (3 min a temperatura ambiente) em 1,0% v/v de Triton-X preparado em água destilada. Então, a solução de Triton-X foi removida dos poços e os hidrogéis lavados 4 vezes com PBS (cada etapa de lavagem durou 5 min). Após lavagem, o DAPI foi adicionado ao sistema na concentração de  $1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$  e as amostras foram incubadas por mais 5 min. A solução resultante foi removida dos hidrogéis e as amostras lavadas com PBS. Então, as placas foram envelopadas com papel alumínio para proteger do contato com a luz e 500  $\mu\text{L}$  de PBS foram adicionados sobre cada poço contendo as amostras. Por fim, a placa foi estocada a  $4^\circ\text{C}$  até as imagens de fluorescência serem obtidas. Imagens de fluorescência foram coletadas de cada amostra em diferentes regiões da superfície dos filmes. Os experimentos foram realizados em triplicata ( $n = 3$ ) na Colorado State University (CSU), USA.

##### 4.6.2.3.2 Via microscopia eletrônica de varredura

Após os ensaios de cultura de células (4 e 7 dias), os hidrogéis foram removidos do meio de cultura e, então, acondicionados em solução 3,7% v/v de glutaraldeído, contendo  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de cacodilato de sódio e  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose por 45 min. Em seguida, as amostras foram adicionadas por 10 min em um tampão de cacodilato

de sódio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  e sucrose  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ . Após esta etapa, os hidrogéis contendo as células fixadas e aderidas em suas superfícies foram adicionados em soluções etanólicas de 35, 50, 70 e  $\approx 100\%$  v/v. Os hidrogéis foram mantidos em contato com cada solução etanólica por 10 min. Por fim, os hidrogéis foram mantidos (10 min) em 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HDMS, Sigma-Aldrich, USA) antes de serem armazenados em dessecador e analisados por SEM.

Para obtenção das imagens SEM indicando as células aderidas, as amostras foram revestidas (10 nm) com liga de paládio-ouro. Então, as imagens foram processadas em um equipamento SEM JSM-6500F (Japão) com aceleração de 5 kV. As análises foram realizadas na Colorado State University (CSU), USA.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 RENDIMENTO DE RETENÇÃO DO TANFLOC NA MEMBRANA DE DIALISE APÓS PURIFICAÇÃO

Inicialmente, a solução de TN (2,5 g) foi submetida à diálise (50 mL de solução de TN a 5,0% m/v). Após diálise, restaram-se apenas 0,23 g de TN no interior da membrana. Após 5 dias de diálise, o TN ainda se encontra solúvel na membrana de diálise. A massa remanescente (0,23 g) foi determinada após proceder o congelamento da amostra dialisada e liofilização. Comparando a massa inicial de TN (2,5 g) com a massa final obtida depois da diálise (0,23 g), determinou-se o rendimento de obtenção do TN, que foi de apenas 9,0%. Portanto, a perda de massa durante a diálise foi de  $\approx 91\%$ . Esse efeito se ocorre devido à presença de oligômeros que são removidos no processo de diálise. A diálise é necessária, uma vez que sem esta etapa de purificação não foi possível obter hidrogéis GE/TN. Nesse caso, a concentração de TN após diálise foi de  $4,6 \text{ g L}^{-1}$ . Esta solução foi usada para preparar os hidrogéis físicos, ressaltando que a mesma foi utilizada logo após o processo de diálise. Antes de obter os materiais, o TN purificado (dialisado) foi congelado e liofilizado. O sólido obtido foi caracterizado por SEM/EDS, FTIR e XPS.

A remoção de oligômeros de TN deve acontecer durante o processo de purificação. A mesma se deve possivelmente a ocorrência da coloração marrom na água do sobrenadante da diálise (Fig. 5). Esta coloração é característica de taninos. A diálise foi realizada com uma membrana de 12 kDa. O tamanho de poro desta membrana é consideravelmente grande. A mesma foi usada, uma vez que **Mangrich et al. (2014)** afirmou que a massa molar do TN fornecido pela TANAC SA é de aproximadamente 600 kDa. No entanto, a amostra de TN em sua grande maioria deve ser constituída de oligômeros de TN, pois, após diálise, a perda de massa foi de 91%. Neste caso, o rendimento de obtenção do TN dialisado foi de 9,0%. Essa porcentagem confere ao TN dialisado concentração de aproximadamente  $4,6 \text{ g L}^{-1}$  no material remanescente dentro da membrana de diálise após os completar 5 dias de processo. Essa solução é usada no preparo de blendas GE/TN para formação dos hidrogéis físicos. Sem dúvida, também deve haver um conteúdo de impureza no TN comercializado pela empresa Tanac S.A. Esse efeito será investigado pela análise de XPS.



**Figura 5 – Processo de diálise do TN.**

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADO DE TANINO AMINO-FUNCIONALIZADO

### 5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura e energia dispersiva de raios-X

O TN é produzido principalmente por meio da catálise ácida de taninos condensados na presença de formaldeído e cloreto de amônio (**GRAHAM et al., 2008**), sendo o TN um cátion orgânico estabilizado por íons cloreto como contra íons. A imagem de SEM do TN não purificado (Fig. 6A) mostra que a estrutura do polímero é formada por partículas esféricas com superfície lisa. A análise de EDS revelou que a estrutura do TN não purificada inclui excesso de átomos de cloro (possivelmente na forma de íons cloreto) e uma pequena quantidade de átomos de potássio. A alta intensidade do pico atribuído aos átomos de cloro no espectro EDS da amostra não purificada ocorre, possivelmente, devido ao excesso de cloreto de amônio usado na síntese do TN. Além disso, o cloreto de amônio utilizado como reagente na síntese pode conter impurezas de cloreto de potássio, conferindo presença de átomos de potássio. Além disso, partículas de madeira e impurezas de ácido fórmico podem estar presentes na estrutura do TN não purificado (**FACCHI et al., 2017b**). Uma solução aquosa de TN não purificado apresenta pH 2,1 devido à ocorrência de ácido fórmico remanescente do processo de síntese. Nota-se que o espectro EDS do TN não purificado (Fig. 6B) não apresenta sinal de átomos de nitrogênio. A presença de impurezas deve perturbar a identificação desse átomo.

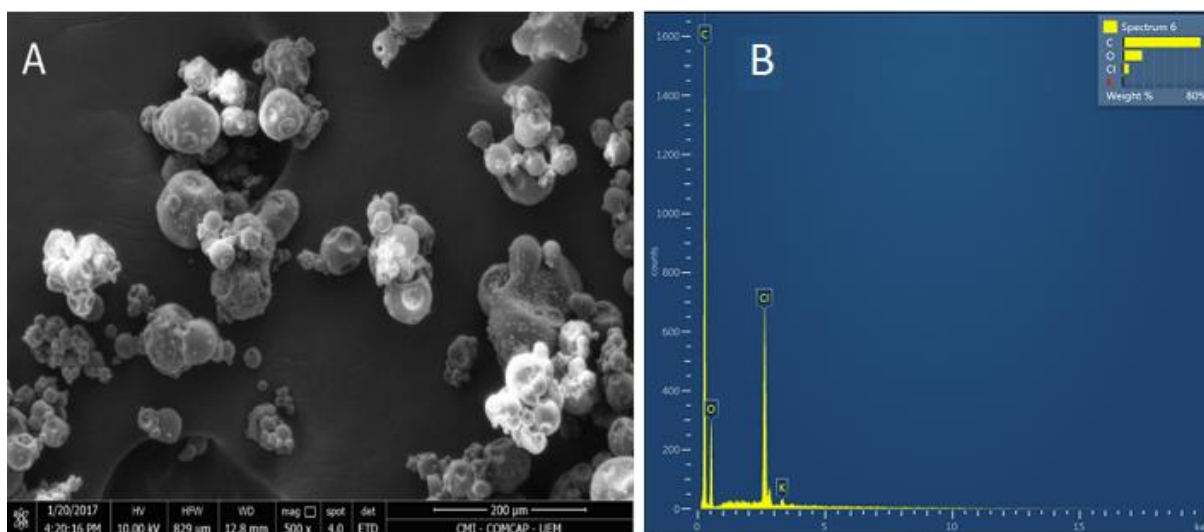


Figura 6 – (A) Micrografia e (B) espectro EDS do TN não purificado. Reproduzido de Martins et al., 2018 com permissão da Elsevier.

A imagem SEM do TN purificado (após diálise) mostrou que o material apresenta estrutura frágil, desorganizada e sem ocorrência de partículas esféricas (Fig. 7A). A formação de "pares iônicos" entre  $-\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$  (na estrutura do TN) e  $\text{K}^+\text{Cl}^-$  (impurezas) deve alterar consideravelmente as propriedades físico-químicas do TN. **Martins et al., (2015)** confirmaram o estabelecimento de pares iônicos entre o sal cloreto de *N,N,N*-trimetilquitosana (TMC) e  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$ . A ocorrência desses pares iônicos alterou significativamente as características físico-químicas da TMC, bem como seu desempenho antimicrobiano (**MARTINS et al., 2015a**). Por outro lado, a diálise da solução de TN pode eliminar esses pares iônicos para fornecer um TN com morfologia frágil e irregular (Fig. 7A). Este comportamento é característico de hidrogéis a base de ácido tânico (**SAHINER et al., 2016**) e hidrogéis a base de TN (**FACCHI et al., 2017b**) já relatados. O espectro EDS do TN purificado fornece um sinal de baixa intensidade para os átomos de cloro e fornece a presença de um pico atribuído à presença de átomos de nitrogênio. Esse efeito confirma que a diálise remove impurezas, tornando possível a identificação de nitrogênio na estrutura do TN (Fig. 7B). O processo de diálise remove impurezas ( $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) do TN não purificado, alterando sua morfologia e estrutura (Fig. 7).

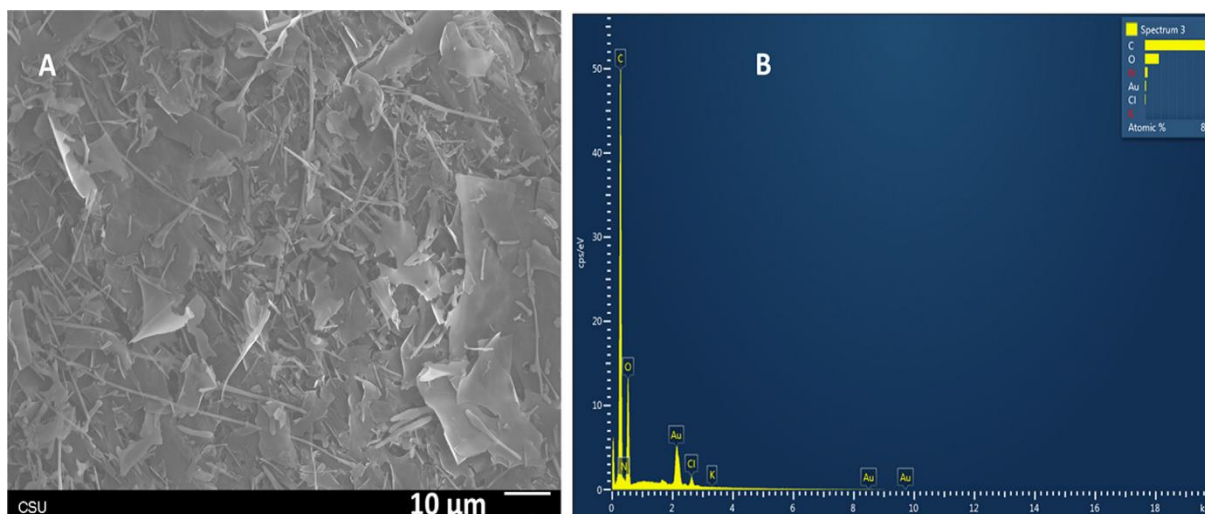


Figura 7 – (A) Micrografia e (B) espectro EDS do TN purificado (obtido após diálise). Reproduzido de Martins et al., 2018 com permissão da Elsevier.

A diálise desempenha um papel importante na solubilidade do TN. Após processo de diálise, as soluções aquosas de TN só podem ser preparadas em condições de pH abaixo de 6,0. Durante a diálise, oligômeros de TN (<12 kDa) podem deixar a solução de TN, conferindo melhor associação entre macromoléculas de TN com elevada massa molar. Este efeito altera a solubilidade do material em água. Os oligômeros de TN removidos na diálise podem ser identificados indiretamente através do método de radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH') (FACCHI et al., 2017b) por meio da análise da absorbância dos sobrenadantes obtidos na diálise .

O TN purificado é obtido por diálise de soluções de TN. Um período longo de diálise pode tornar o TN insolúvel mesmo em soluções ácidas diluídas. Portanto, o tempo de diálise é um parâmetro significativo que influencia na solubilidade do TN (MARTINS et al., 2018a). Para criar soluções de TN em ácidos diluídos, o tempo de diálise deve ser padronizado. Após diálise de 5 dias o TN permaneceu solúvel em água deionizada (pH 5,5).

### 5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

A Fig. 8 apresenta os espectros de FTIR do TN antes (TN impuro) e o TN obtido após processo de diálise (TN purificado). Os espectros de FTIR mostraram diferenças significativas, ratificando que a estrutura do TN deve mudar após o processo de diálise, devido à remoção de impurezas e, possivelmente oligômeros de TN.



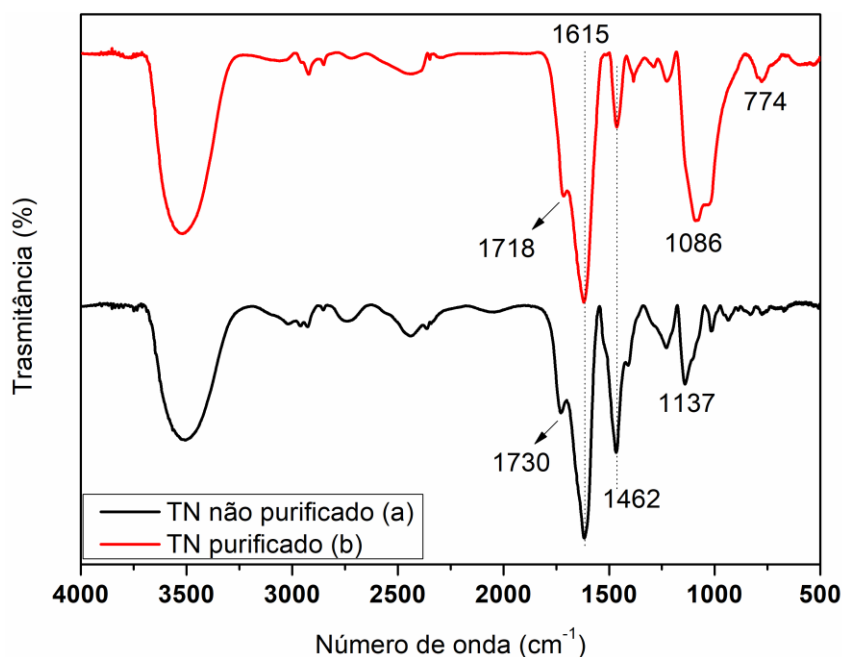
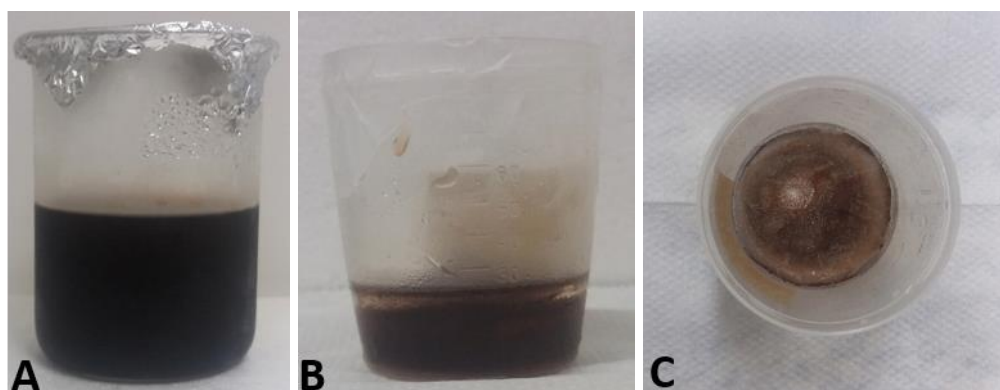


Figura 8 – Espectros de FTIR do TN antes (a) e após (b) diálise.

Os espectros de FTIR do TN antes e depois da diálise mostram bandas em 1730 e 1718  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas principalmente ao estiramento das ligações C=O de ácidos carboxílicos. A ocorrência deste sinal está relacionada à presença de taninos hidrolisáveis, envolvendo conteúdos de ácido gálico na matriz do TN (FACCHI et al., 2017b). Sugere-se que deslocamento desta banda (de 1730 para 1718  $\text{cm}^{-1}$ ) se deve a mudança de pH do sistema. Antes da purificação, soluções aquosas de TN indicam pH de 2,1, enquanto a solução dialisada apresenta pH em torno de 5,5. Além disso, essa alteração espectral pode ser devido à existência de impurezas de ácido fórmico (reagente utilizado na síntese do TN) na amostra não purificada. Com a diálise, o ácido fórmico é removido e a alteração do pH influenciou no deslocamento da banda referente ao estiramento das ligações C=O de ácidos carboxílicos. Os sinais intensos em 1615 e 1462  $\text{cm}^{-1}$  estão relacionadas aos estiramentos das ligações C=C e O-H, respectivamente, e se devem (principalmente) à presença dos grupos fenóis presentes na estrutura dos taninos condensados (FACCHI et al., 2017b). Entretanto, as diferenças mais significativas entre os espectros FTIR foram observadas com relação ao estiramento das ligações C-O-H (em 1137  $\text{cm}^{-1}$  no espectro do TN não dialisado e 1086  $\text{cm}^{-1}$  no espectro do TN purificado). A maior intensidade e o alargamento da banda em 1086  $\text{cm}^{-1}$  em relação à banda em 1137  $\text{cm}^{-1}$  pode-se inferir ao aumento da efetividade das interações intermoleculares

envolvendo as macromoléculas do TN após diálise. A remoção de impurezas e oligômeros durante a diálise favoreceu a ocorrência de interações entre as macromoléculas de TN. Este efeito explica a diferença entre os espectros de FTIR.

Esse efeito também corrobora com a menor solubilidade do TN purificado em relação ao TN impuro. A Fig. 9, mostram imagens digitais da solução de TN recém dialisada (Fig. 9A), da solução de TN dialisada e congelada em freezer por 12 h (Figs. 9B e 9C). Se a solução de TN dialisada for congelada, o TN precipita durante o processo de congelamento (Fig. 9). A precipitação é irreversível e, depois desse evento não é mais possível obter soluções aquosas de TN, mesmo em soluções de ácidos diluídos, ou seja, mesmo tornando o TN catiônico em meio ácido, não se consegue solubilizar o material (Figs. 9B e 9C). Por isso, a solução de TN deve ser utilizada logo depois do processo de diálise, sem efetuar o processo de congelamento e liofilização. O resfriamento da solução dialisada, contendo macromoléculas de TN, favorece a aproximação de cadeias de TN, propiciando interações efetivas entre os segmentos de cadeias do TN. Essas interações são tão efetivas, que acabam levando à formação de precipitados de TN insolúveis em meio aquoso (Fig. 9C).



**Figura 9 – Solução de TN recém dialisada, obtida após 5 dias de diálise (Fig. 9A), e solução de TN dialisada e congelada, mostrando a formação de precipitados de TN (Figs. 9B e 9C).**

Por fim, a banda em  $774\text{ cm}^{-1}$ , observada apenas no espectro do TN purificado é atribuída as ligações C–H de anéis aromáticos. Este sinal se deve a deformação angular da ligação dupla entre carbonos. Mais uma vez, a remoção das impurezas e oligômeros de TN favorece a interação entre as macromoléculas, ocasionando mudanças significativas nos espectros de FTIR. A caracterização após diálise se mostrou eficiente para confirmar a purificação do TN, uma vez que os resultados obtidos através dos espectros de FTIR para o TN dialisado são condizentes com

grupos químicos característicos da estrutura do TN (um derivado de taninos condensados).

### 5.2.3 Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS)

Na Fig. 10 é mostrado espectros XPS (survey) do TN antes e após diálise (amostra purificada). Os espectros XPS mostraram presença de picos característicos referentes aos elementos de oxigênio (O1s em 534 eV), nitrogênio (N1s em 401 eV), carbono (C1s em 287 eV), cloro (Cl2p em 200 eV) e enxofre (S2p em 164 eV) (Fig. 10). A diferença entre os espectros, confirmam o processo de purificação do TN. O processo de diálise remove espécies de cloro (possivelmente íons cloreto, pois os sinais atribuídos a esse elemento (Cl2s e Cl2p) ocorrem com menor intensidade no XPS da amostra purificada), enxofre (S2p), potássio (K2s em 380 eV) e cálcio (Ca2p em 348 eV) na superfície do TN não purificado. Alguns desses elementos, tais como enxofre, potássio e cálcio não são identificados no espectro XPS da amostra purificada. Esses elementos são removidos da superfície do TN após diálise, mostrando que o processo de purificação foi eficiente. Além disso, após dialise, ocorre aumento do teor de O1s, C1s e N1s na superfície do TN purificado, mostrando que dados de XPS estão de acordo com os resultados obtidos no EDS.

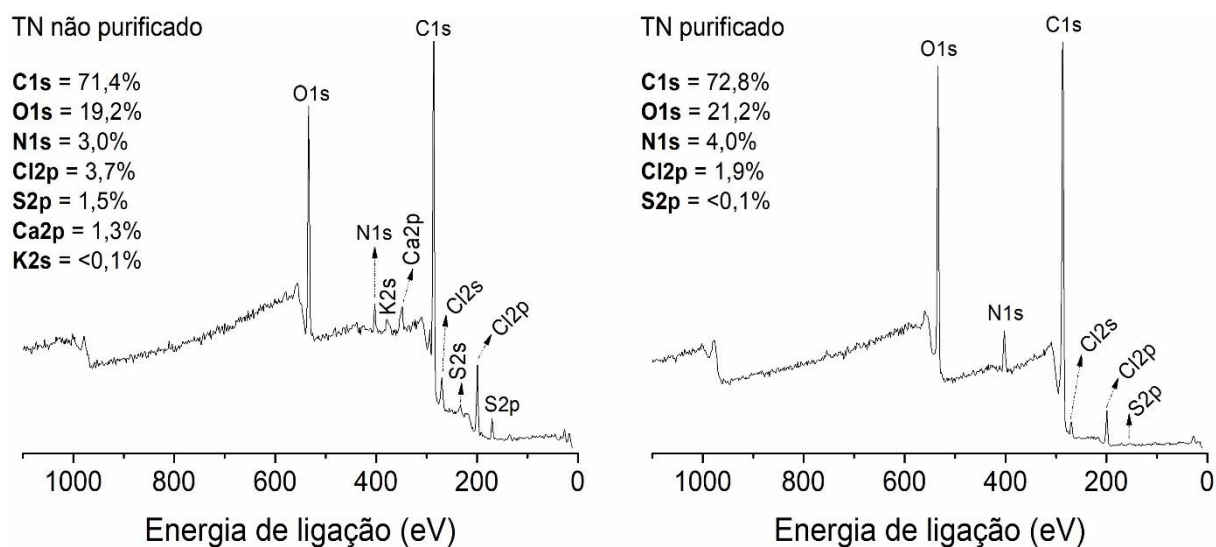
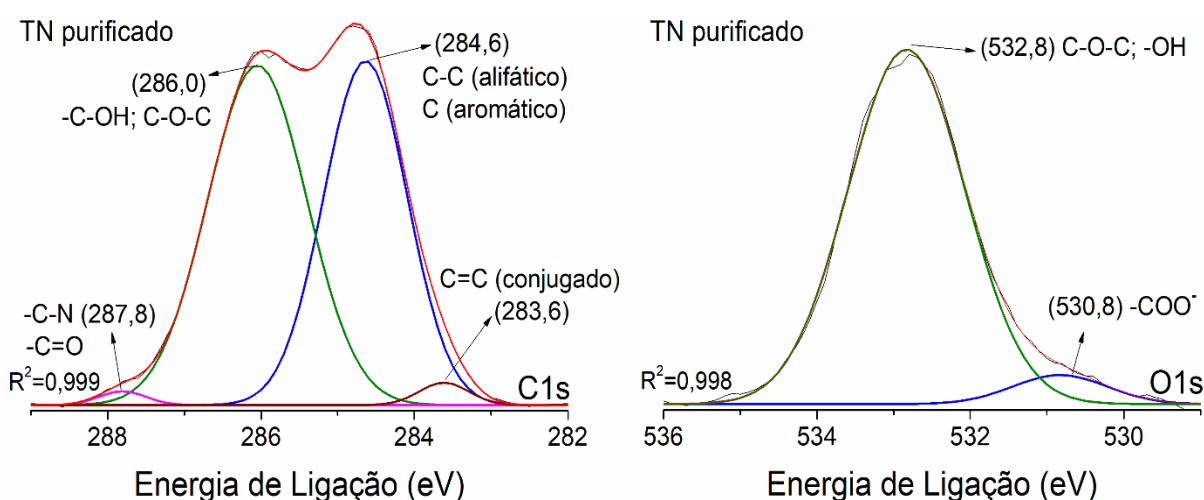


Figura 10 – Espectros XPS (survey) do TN antes e após purificação.

Na Fig. 11 é mostrado os espectros XPS de alta resolução para os envelopes C1s e O1s do TN purificado. Os espectros de alta resolução apresentaram sinais característicos de ligações  $-C-C$ ,  $-C-H$ ,  $C=C$ ,  $-C-O-C$ ,  $-C-N$ , e  $-OH$  presentes na superfície do TN purificado. Os espectros dos envelopes C1s e O1s mostram também a ocorrência dos grupos químicos  $-C=O$  e  $-COO^-$ , respectivamente. Esses grupamentos ocorrem devido à presença de taninos hidrolisáveis (Fig. 3) na superfície do TN purificado. Desta forma, a amostra de TN catiônico, apresenta também taninos hidrolisáveis que possuem característica aniônica. Essa característica deve influencia na formação dos hidrogéis, uma vez que, a GE também possui grupamentos aniônicos e catiônicos em sua estrutura. Todos os sinais atribuídos nos espectros XPS relatados neste estudo estão em acordo com outros dados já publicados (**BRIGGS, 1981; D'ALMEIDA et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2019; HUANG et al., 2010**).



**Figura 11 – Espectros de alta resolução dos envelopes C1s e O1s obtidos na superfície do TN purificado.**

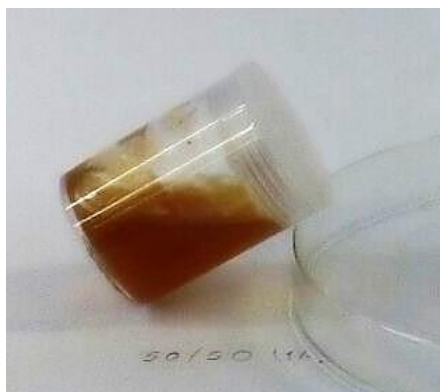
### 5.3 OBTENÇÃO DOS HIDROGÉIS GE/TN

A Tabela 2 indica as condições experimentais utilizadas no preparo dos hidrogéis. Independentemente da concentração de partida da solução de GE, hidrogéis não foram obtidos na razão GE/TN 30/70 v/v (Tabela 2). O excesso de TN inibiu a gelificação do sistema, possivelmente devido ao excesso de densidade de carga positiva e baixa concentração de GE na blenda. A presença de GE promove estabilidade ao hidrogel, possibilitando o processo de gelificação pelo resfriamento

das blendas GE/TN, pois a GE adquire conformação de tripla hélice com o resfriamento das soluções.

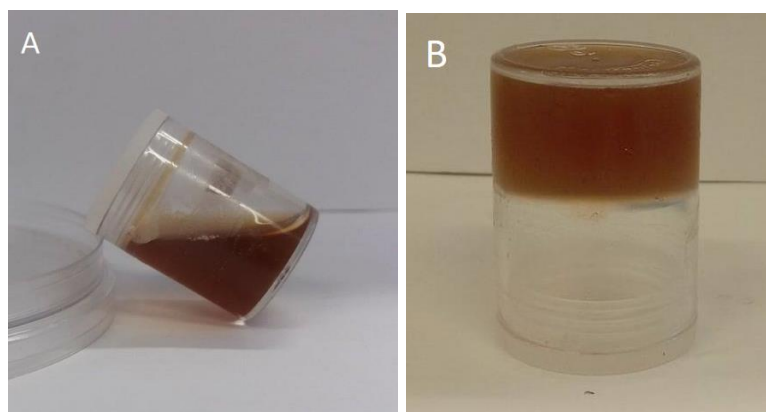
Na concentração de GE 1,0% m/v, obteve-se hidrogel apenas na razão GE/TN de 90/10 (v/v). Porém, esse material não apresentou consistência e sua aplicação foi descartado. Nas outras condições (razão v/v de GE/TN = 70/30, 50/50 e 30/70) não foi observado a formação de hidrogéis partindo-se de soluções GE a 1,0% m/v. A Fig. 12 ilustra uma imagem digital do sistema GE/TN na razão 50/50 (v/v), o qual não apresentou gelificação. Para ocorrer formação dos hidrogéis, precisa-se aumentar a concentração de GE na blenda. A GE possui capacidade de formar hidrogéis estáveis em baixas temperaturas, desde que a concentração de GE na solução seja no mínimo de 1% (**NEKLYUDOV, 2003**). No entanto, esses hidrogéis não apresentam durabilidade (**NEKLYUDOV, 2003**), sendo o potencial de aplicação desses materiais extremamente limitados. Estudos mostram que taninos podem se associar efetivamente com proteínas (**COSTA et al., 2008**).

Por isso, hidrogéis GE/TN foram preparados com sucesso quando soluções de GE nas concentrações 2,0, 3,0, e 4,0% m/v foram associadas com alíquotas das soluções de TN a 4,6 g L<sup>-1</sup> (Tabela 2). Por outro lado, as blendas GE/TN devem ser preparadas com no mínimo 50 vol% com soluções GE nas suas respectivas concentrações de 2,0, 3,0, e 4,0% m/v (Tabela 2). Quando soluções GE 5,0% m/v foram usadas, blendas GE/TN não foram obtidas, ou seja, a mistura GE/TN não foi estável e apresentou formação de precipitados. Neste caso, o TN funcionou como um agente precipitante da GE, levando a formação de hidrogéis físicos convencionais (comumente denominados de complexos polieletrólíticos (PECs), os quais são obtidos via precipitação de polieletrólitos em solução (**FACCHI et al., 2017b**). Por isso, este estudo envolveu o uso de soluções de GE preparadas na faixa de concentração entre 2,0 a 4,0% m/v.



**Figura 12 – Imagem digital do sistema preparado com GE a 1,0% m/v na razão GE/TN 50/50 v/v. Nesse caso, não houve gelificação da blenda GE/TN.**

Utilizando esta faixa de concentração de 2,0 a 4,0% m/v para as soluções de GE, hidrogéis PECs (não convencionais, ou seja, hidrogéis físicos que não são obtidos por precipitação) termossensíveis e termorreversíveis foram obtidos nas razões GE/TN 50/50, 70/30 e 90/10 (v/v). Vale a pena destacar que hidrogéis de GE não são obtidos por meio do resfriamento de soluções aquosas de GE sem a presença de TN, mesmo partindo-se de soluções com elevadas concentrações (5% m/v). Quando o TN não purificado foi utilizado, não houve formação de hidrogel em nenhuma condição apresentada na Tabela 2. A Fig. 13 apresenta imagens digitais da blenda GE/TN a 50 °C prepara a partir da solução GE a 4,0% m/v (Fig. 13A) e do hidrogel termossensível obtido após resfriamento da blenda para 25 °C (Fig. 13B). Neste caso, o hidrogel físico GE/TN foi criado a partir da condição 13 (Tabela 2), ou seja, por meio do resfriamento da blenda (preparada com solução GE a 4,0% m/v) na razão GE/TN 50/50 (v/v).



**Figura 13 – Imagens digitais do sistema preparado com GE a 4,0% m/v na razão GE/TN 50/50 v/v: (A) blenda GE/TN a 50°C e (B) hidrogel GE/TN obtido a 4°C.**

Os hidrogéis termossensíveis foram estáveis quando preparados com soluções de GE na faixa de concentração entre 2,0 a 4,0% m/v; no entanto, aqueles preparados a partir de soluções GE a 4,0% m/v se mostraram mais consistentes. Por isso, conteúdos apropriados da solução de TN na blenda GE/TN favorecem a reticulação física e formação de PECs GE/TN (Tabela 2). A diminuição da temperatura promove aproximação das cadeias poliméricas, induzindo formação de interações (eletrostáticas e intermoleculares) entre os segmentos de cadeias dos polímeros e, conseqüente formação dos hidrogéis. Taninos tem como uma de suas ações moleculares, complexar com proteínas através do estabelecimento de interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas **(COWAN, 1999)**.

As ligações de hidrogênio são estabelecidas entre as hidroxilas dos grupos fenóis do TN com as unidades peptídicas das proteínas. As interações hidrofóbicas ocorrem entre os núcleos aromáticos dos taninos e as cadeias laterais alifáticas e aromáticas dos aminoácidos proteicos presentes na GE **(COSTA et al., 2008)**. Ainda, o TN deve interagir eletrostaticamente com a GE estabilizando a estrutura tridimensional (tripla hélice) da GE. As interações eletrostáticas ocorrem entre os grupos  $-NH_3^+$  do TN com os ânions carboxilatos da GE e, ainda pode ocorrer estabelecimento de interações eletrostáticas entre os ânions carboxilatos dos taninos hidrolisáveis presentes no TN com grupos catiônicos da GE (aminas protonadas). Em pH 5,5, todas essas interações de cargas opostas podem ocorrer, pois esse pH está próximo dos valores de  $pK_a$  do TN e GE. Quando soluções de GE a 5,0% m/v são utilizadas, ocorre precipitação de um material, quando o TN é gotejado sobre a solução de GE. Isso se deve à maior efetividade de interação. Isso é provocado pelo aumento da concentração de GE no sistema. Por isso, a faixa de concentração de GE estudada para formação de hidrogéis físicos não convencionais foi de 1,0 a 4,0% m/v.

## 5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS GE/TN

### 5.4.1 Determinação da temperatura de gelificação e reologia oscilatória

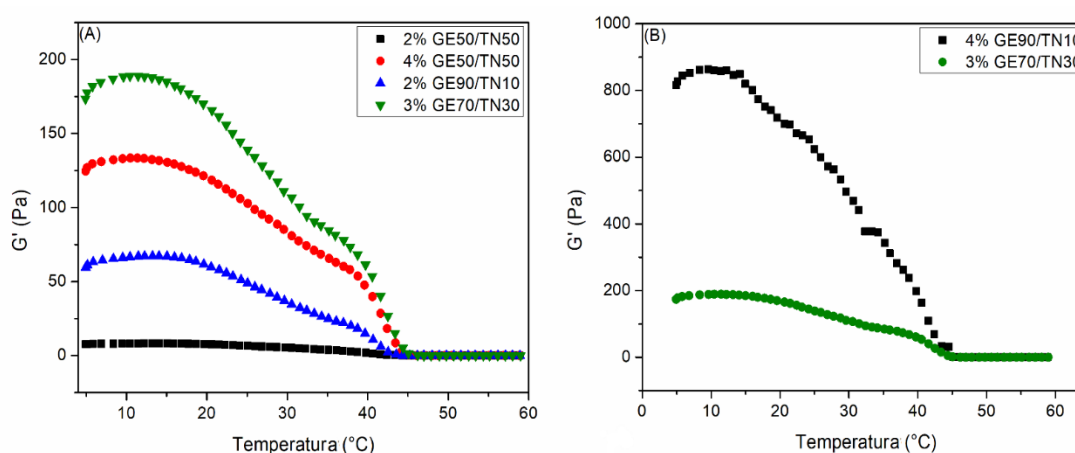
A Fig. 14 ilustra o comportamento do módulo de armazenamento ( $G'$ ) em função da temperatura para o sistema GE/TN. A propriedade  $G'$  apresentou valores

mais altos em temperaturas baixas ( $T < 40^{\circ}\text{C}$ ), pois a característica elástica do sistema é dominante, indicando formação de hidrogéis GE/TN termossensíveis. Como esperado, o aumento da concentração de GE nas blendas favoreceu para o aumento de  $G'$  em baixas temperaturas. Este resultado ocorre devido às interações efetivas (já discutidas) no sistema que são alavancadas com a maior teor de GE na blenda.

O hidrogel obtido com solução GE a 2,0% m/v e razão GE/TN 50/50 (v/v) mostrou valor de  $G'$  muito baixo (em torno de 8,0 Pa) na região de 5 a 15 °C (Fig. 14A). Por outro lado, o hidrogel GE/TN obtido a partir de soluções GE a 4,0% m/v na mesma proporção GE/TN (50/50 v/v) apresentou  $G'$  em torno de 150 Pa na faixa de 5 a 15 °C (Figs. 14A e 14B). Mantendo a concentração de GE a 4,0% m/v, mas usando a razão GE/TN 90/10 (v/v), o material apresentou  $G'$  de aproximadamente 800 Pa na mesma faixa de temperatura (Fig. 14B). Esses resultados indicam que o aumento da concentração da solução de GE usada para obter as blendas desempenha um papel significativo nos valores de  $G'$  do sistema GE/TN. Hidrogéis com maiores valores de  $G'$  são mais consistentes. Este fato foi observado por **Zandi, Mirzadeh e Mayer (2007)**, onde estudaram o comportamento de soluções de GE tipo A nas concentrações de 1,0, 3,0, e 5,0% m/v através de reologia por testes oscilatórios, medindo os módulos de armazenamento durante a  $T_{\text{sol-gel}}$  em função da temperatura e da concentração. Esses pesquisadores também observaram a dependência da temperatura de gelificação das soluções de gelatina em função da concentração de GE. O aumento da concentração de GE promove aumento da viscosidade do sistema (solução de GE), que é incrementada ainda mais com a diminuição da temperatura. Durante a rampa de resfriamento, uma grande quantidade de hélices triplas é formada e o estabelecimento da rede do gel se mostra sensível à concentração de GE. Ou seja, ao continuar diminuindo a temperatura, observa-se que interações efetivas ocorrem entre os segmentos de cadeias da GE e TN, que resultam no aumento do módulo  $G'$  e, conseqüentemente leva à formação do hidrogel.

Analisando o comportamento de  $G'$  durante o aquecimento, observa-se que em temperaturas elevadas, o módulo de armazenamento diminui consideravelmente, atingindo valores próximo de zero a partir de a 45 °C (Fig. 14). Acima desta temperatura, todas as condições descritas na Tabela 2 que promoveram a formação de hidrogéis ocorrem no estado líquido.





**Figura 14 – Medidas de  $G'$  em função da temperatura para os sistemas GE/TN produzidos a partir das condições experimentais previstas na Tabela 2.**

A  $T_{\text{sol-gel}}$  foi obtida por meio da primeira derivada das curvas de  $G'$  em função da temperatura (Tabela 3). A temperatura do ponto de inflexão se refere à temperatura relacionada à transição sol-gel, ou seja, a temperatura de gelificação (temperatura na qual o sistema perde a característica elástica de gel e volta a ser uma solução líquida). Nesse ponto, observa-se o decréscimo brusco dos valores de  $G'$  conforme observado na Fig. 14. A temperatura de gelificação não variou significativamente, mesmo alterando a concentração das soluções GE utilizadas no preparo das blends, bem como a razão GE/TN (v/v). Neste caso, o TN deve atuar como um agente de reticulação da GE. Assim, pela adição de quantidades apropriadas (alíquotas) da solução de TN ( $4,6 \text{ g L}^{-1}$ ) nas soluções de GE (2,0, 3,0 e 4,0% m/v), pode-se obter hidrogéis termossensíveis e estáveis com temperaturas de gelificação acima da temperatura média do corpo humano ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Neste caso, em uma provável aplicação, os hidrogéis devem manter sua integridade física, fato requerido em uma possível aplicação prática destes materiais. Não há relatos na literatura de hidrogéis PECs a base de GE e TN como os relatados neste estudo.

**Tabela 3 – Temperaturas de gelificação ( $T_{\text{sol-gel}}$ ) dos hidrogéis GE/TN processados de acordo com as condições descritas na Tabela 2.**

Condição (Tabela 2)	GE% m/v	GE/TN (v/v)	$T_{\text{sol-gel}}$ ( $^\circ\text{C}$ )
5	2	50/50	40
13	4	50/50	42
7	2	90/10	41
15	4	90/10	42
10	3	70/30	42

Na Figura 15 temos o comportamento dos módulos elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) em função da frequência oscilatória. Esses gráficos mostram resultados referentes aos hidrogéis preparados por meio da combinação de alíquotas das soluções GE a 4,0% m/v e TN ( $4,6 \text{ g L}^{-1}$ ), pois foram as amostras que apresentaram maiores módulos de  $G'$  quando comparado aos demais sistemas analisados (Fig. 14). As outras amostras, devido aos valores baixos de  $G'$  (obtidos mesmo em baixas temperaturas) não apresentam consistência mecânica adequada. Por isso, apenas os hidrogéis obtidos a partir de soluções GE a 4,0% m/v serão estudados a partir desse ponto. A consistência do hidrogel pode ser avaliada com base nos valores de  $G'$  (AHEARNE, YANG e LIU, 2008), pois em temperaturas abaixo da  $T_{\text{sol-gel}}$ , interações efetivas (interações eletrostáticas e intermoleculares) são estabelecidas entre GE e TN, sendo que essas interações efetivas dependentes da razão GE/TN usada na composição final da blenda.

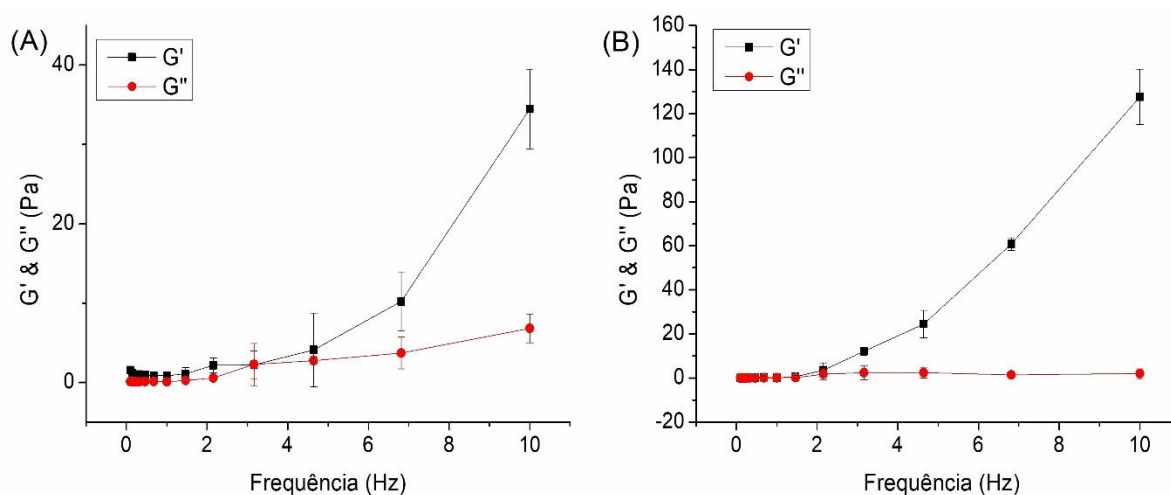


Figura 15 – Medidas de  $G'$  e  $G''$  em função da frequência para os sistemas GE/TN preparados a partir de blends com GE a 4,0% m/v e proporção GE/TN (v/v): (A) 50/50 e (B) 90/10.

Os ensaios de  $G'$  &  $G''$  em função da frequência oscilatória foram realizados para determinar a natureza dos hidrogéis, ou seja, se prevalece o estado gelificado (gel) ou líquido (de solução). Para  $G' > G''$ , o material se comporta mais como gel (estado gelificado prevalece); isto é, as deformações serão essencialmente elásticas ou recuperáveis (característico de gel). Por outro lado,  $G' < G''$  a energia usada para deformar o material é dissipada viscosamente e o comportamento dos materiais é semelhante a um líquido (RAO, 2014). Observou-se que os valores de  $G'$  são significativamente maiores que  $G''$ , confirmando que os hidrogéis preparados nas a

partir de soluções de GE a 4,0% m/v (condições 13 e 15; Tabela 2) se comportam como gel (Fig. 15).

#### 5.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho

A Fig. 16 mostra os espectros FTIR dos precursores (GE e TN purificado) e dos hidrogéis GE50/TN50 e GE90/TN10. O espectro do TN purificado já foi apresentado anteriormente na seção 5.1.2. No espectro referente à GE, observam-se bandas características em  $1634\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento das ligações C=O de amida I e ânion carboxilato,  $1538\text{ cm}^{-1}$  atribuída a deformação angular da ligação N–H das ligações peptídicas e ao estiramento no plano de ligações CN (amida II), banda em  $1238\text{ cm}^{-1}$  correspondente aos estiramento no plano das ligações C–N de amida III e na região de  $3290\text{ cm}^{-1}$ , verificou-se uma banda intensa atribuída ao estiramento axial do grupo das ligações O–H. A GE como toda proteína, se caracteriza pelas bandas de vibração das ligações amidas, as vibrações Amida I, Amida II e Amida III, sendo as principais (GALLAGHER, 2009; KONG e YU, 2007; MANDAL et al., 2012; ZHA et al., 2012). Resultados similares foram obtidos por Araújo et al. (2017), que estudou e caracterizou a estrutura de membranas de GE/quitosana para liberação de fármacos. Os espectros FTIR das membranas apresentaram bandas características atribuídas à estrutura da GE e quitosana, as quais comprovaram a formação da matriz polimérica.

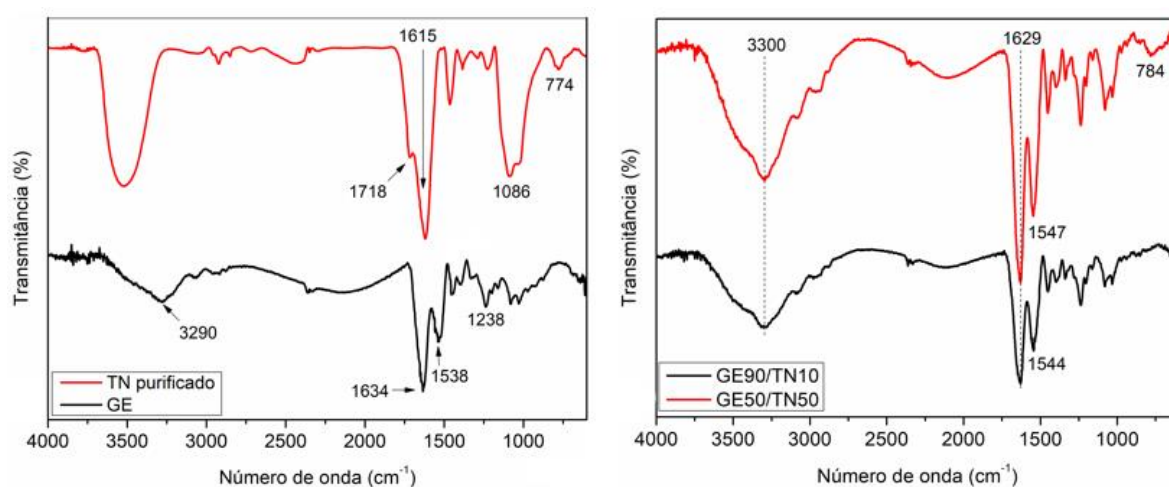


Figura 16 – Espectros FTIR dos precursores GE, TN e dos hidrogéis GE/TN.

Nos espectros FTIR dos hidrogéis GE/TN, observa-se que os mesmos apresentam as mesmas bandas características que ocorrem no espectro FTIR da GE; no entanto, algumas bandas foram deslocadas, possivelmente devido ao estabelecimento de interações das cadeias de GE com o TN. O aumento do conteúdo de GE nos hidrogéis alterou o perfil da banda O–H na região de  $3300\text{ cm}^{-1}$  nos espectros FTIR dos hidrogéis **(ANVARI e CHUNG, 2016)**. Esse efeito está associado à intensidade das interações de ligações de hidrogênio entre GE e TN. Um maior alargamento da banda ocorrente nessa região espectral indica maior efetividade de interação entre os polímeros **(ANVARI e CHUNG, 2016; HAMEED et al., 2016)**. Esse efeito é pronunciado no hidrogel GE50/TN50. O TN deve estabilizar a GE e as interações de ligação de hidrogênio devem promover um papel importante na formação do material. Analisando-se os espectros FTIR dos hidrogéis, percebe-se o espectro da amostra GE50/TN50 apresenta a banda em  $784\text{ cm}^{-1}$  que pode ser atribuída aos estiramentos das ligações C–H de anéis aromáticos que ocorrem no TN **(PAVIA et al., 2010)**. Essa banda aparece apenas no espectro FTIR do hidrogel GE50/TN50 devido ao maior conteúdo de TN na amostra. Esses resultados indicam que os hidrogéis GE/TN são obtidos com sucesso.

#### 5.4.3 Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X

Espectros XPS (survey) dos hidrogéis GE/TN preparados a partir de blendas GE a 4,0% m/v estão apresentados na Fig. 17. Os espectros XPS mostraram presença de picos referentes aos átomos de oxigênio (O1s em 534 eV), nitrogênio (N1s em 401 eV), carbono (C1s em 287 eV) e enxofre (S2p em 164 eV) **(MARTINS et al., 2018b)**. A porcentagem atômica de cada elemento encontrada na superfície das amostras está indicada nos respectivos espectros XPS (Fig. 17). A ocorrência de enxofre (S2p = 0,2%) confirmou a presença de GE nos hidrogéis, uma vez que o TN não possui este átomo em sua estrutura (Fig. 17). É de notar que quando aumenta a proporção GE/TN, o teor N1s aumentou de 6,0% para 13,6%, conferindo um pico mais intenso em 401 eV no espectro XPS da amostra GE90/TN10 (Fig. 17). Quando comparado ao TN, a GE possui maior conteúdo de átomos de nitrogênio em sua estrutura, uma vez que proteínas contêm um elevado conteúdo de grupos amino e amida em suas estruturas. O conteúdo de carbono também diminuiu de 75,2% para 67,1% quando a proporção

de GE aumentou de 50% em volume para 90% em volume na composição final da blenda GE/TN (Fig. 17). Esses resultados estão em acordo com os dados de composição das blendas GE/TN utilizadas no preparo dos hidrogéis (Tabela 2).

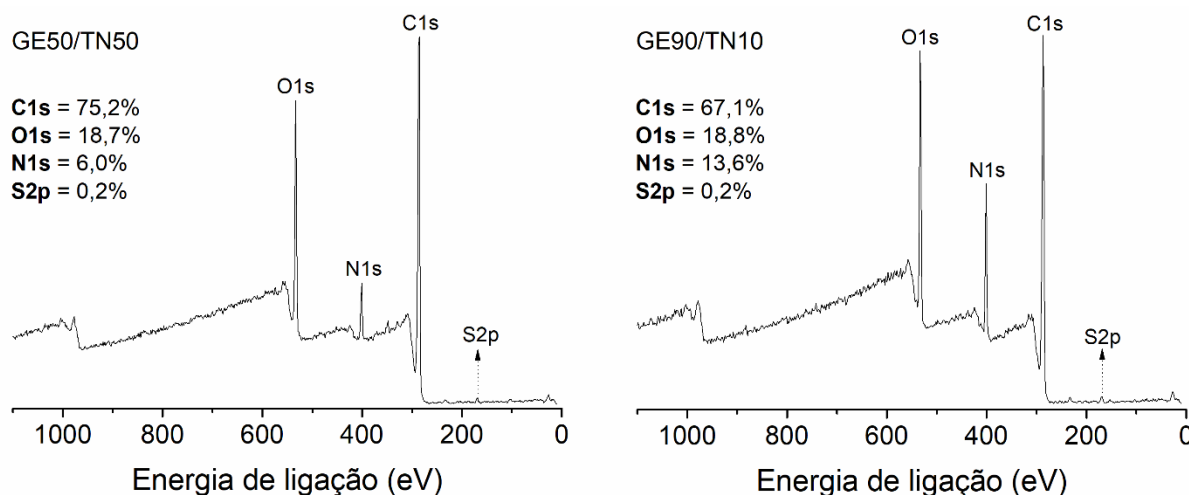


Figura 17 – Espectros XPS (survey) dos hidrogéis GE/TN obtidos a partir de blendas com solução GE a 4% m/v em diferentes proporções GE/TN (50/50 e 90/10).

Espectros XPS de alta resolução (O1s, N1s e C1s) estão apresentados na Fig. 18. Os espectros de alta resolução mostraram sinais característicos dos grupos químicos  $-C-O-C-$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ , e  $-NH_3^+$  presentes nas estruturas da GE e TN (Fig. 18). Os espectros O1s e C1s também mostraram ocorrência de picos característicos referentes aos grupos  $-COOH$  e  $-COO^-$  da GE (XU et al., 2012). Os sinais característicos de tais grupos são relatados em espectros XPS de trabalhos já relatados na literatura (DE OLIVEIRA et al., 2019; MARTINS et al., 2018b). Vale ressaltar, que o TN também apresenta em sua composição conteúdos de taninos hidrolisáveis. Esses materiais apresentam ácido gálico em sua estrutura. Portanto, os picos atribuídos aos grupos  $-COOH$  e  $-COO^-$  são também devido à ocorrência de taninos hidrolisáveis no TN.

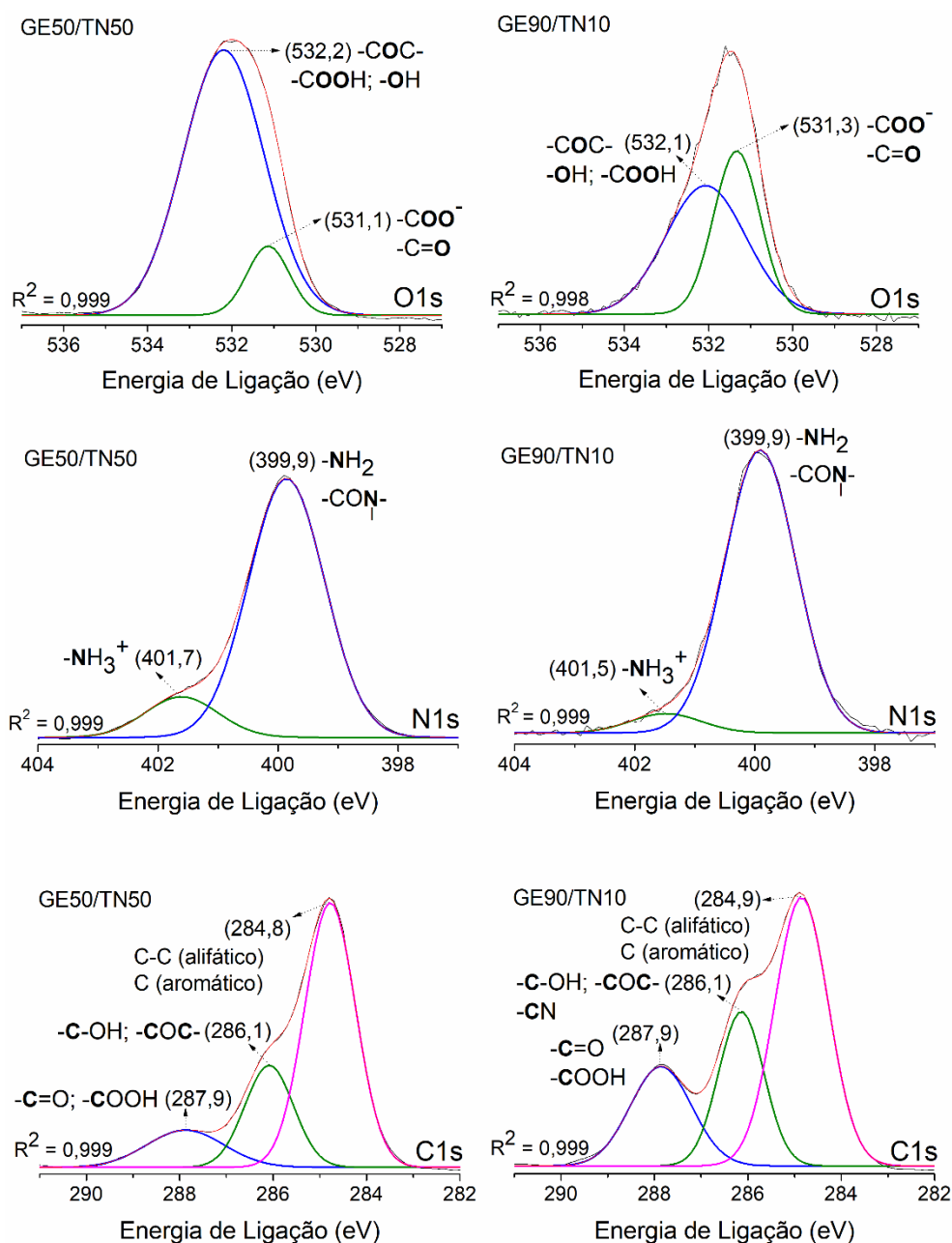


Figura 18 – Espectros de alta resolução dos envelopes O1s, N1s e C1s.

Os hidrogéis são preparados a partir de blendas obtidas com pH em torno de 5,5 (pH da água deionizada, utilizada na diálise do TN e usada para preparar a solução de GE); condição de pH que se encontra acima do ponto isoelétrico (4,8-5,1) da GE do tipo B usada neste estudo (**SMITH, MOXON e MORRIS, 2016**). Sendo assim, a GE atua como um polieletrólito aniônico na mistura GE/TN, enquanto o TN tem papel como polieletrólito catiônico, pois os grupos amino em sua estrutura possuem  $pK_a = 6,0$  (**FACCHI et al., 2017b**). Portanto, a mistura entre estes dois polímeros leva à

formação de PECs. Na Tabela 4 temos as razões ânion/cátion ( $-\text{COO}^-/-\text{NH}_3^+$ ) das superfícies dos hidrogéis GE/TN.

**Tabela 4 – Razão dos grupos  $-\text{COO}^-$  e  $-\text{NH}_3^+$  dos sistemas GE/TN.**

Amostras	<sup>a</sup> $-\text{COO}^-$	<sup>b</sup> $-\text{NH}_3^+$	$-\text{COO}^-/-\text{NH}_3^+$
<b>GE50/TN50</b>	697,22	197,78	3,52
<b>GE90/TN10</b>	2130,60	165,11	12,9

<sup>a</sup>Área do pico (aproximadamente em 531 eV) nos espectros XPS O1s de alta resolução (Fig. 18).

<sup>b</sup>Área do pico (aproximadamente em 401-402 eV) nos espectros XPS N1s alta resolução (Fig. 18).

Os valores das razões foram determinados a partir da razão entre as áreas dos picos referentes aos grupos  $-\text{COO}^-$  (531 eV) e  $-\text{NH}_3^+$  (401-402 eV) nos espectros XPS O1s e N1s de alta resolução, respectivamente (Fig.18). Quando aumenta a concentração de TN na blenda, a razão  $-\text{COO}^-/-\text{NH}_3^+$  diminui (fica mais próximo de um, onde tem-se o equilíbrio de cargas), promovendo maior estabilidade ao hidrogel. O hidrogel GE50/TN50 apresentou estabilidade em solução tampão PBS (pH 7,4) por até 7 dias de incubação, mantendo sua estrutura. Por outro lado, o hidrogel GE90/TN10 não apresentou estabilidade em solução tampão PBS devido ao excesso de GE (99,2% de massa) e elevada razão  $-\text{COO}^-/-\text{NH}_3^+$  (12,9). O maior conteúdo de densidade de carga negativa promove instabilidade ao PEC. Por isso, esse material se desintegra rapidamente em PBS.

Também foi determinado a porcentagem relativa de grupos  $-\text{NH}_3^+$ , bem como, a razão  $-\text{NH}_2/-\text{NH}_3^+$  na superfície dos hidrogéis, por meio das áreas dos picos preditos nos espectros XPS dos envelopes N1s de alta resolução na Fig. 18 (Tabela 5). Verificou-se que o aumento do teor de TN na blenda, elevou o teor de  $-\text{NH}_3^+$  na superfície do material, confirmando que o TN atua como polieletrólito na formação do hidrogel. Por outro lado, os grupos  $-\text{NH}_2$  ocorrem em maior proporção na superfície de ambos os hidrogéis. Estes grupos devem favorecer à ocorrência de interações intermoleculares de ligação de hidrogênio entre os polímeros GE e TN. Todos os sinais atribuídos nos espectros XPS relatados neste estudo estão em acordo com outros dados já publicados (BRIGGS, 1981; D'ALMEIDA et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2019; MARTINS et al., 2018b).

**Tabela 5 – Percentual relativo de grupos  $-\text{NH}_3^+$  e razão  $-\text{NH}_2/-\text{NH}_3^+$  nos hidrogéis GE/TN determinados por meio dos espectros XPS de alta resolução N1s.**

Amostras	<sup>a</sup> $-\text{NH}_2$	<sup>b</sup> $-\text{NH}_3^+$	<sup>c</sup> $-\text{NH}_3^+$ (%)	$-\text{NH}_2/-\text{NH}_3^+$
<b>GE50/TN50</b>	1313,07	197,78	13,09	6,64
<b>GE90/TN10</b>	2441,90	165,11	6,33	14,79

<sup>a</sup>Área do pico (aproximadamente em 400 eV) nos espectros XPS N1s de alta resolução (Fig. 18).

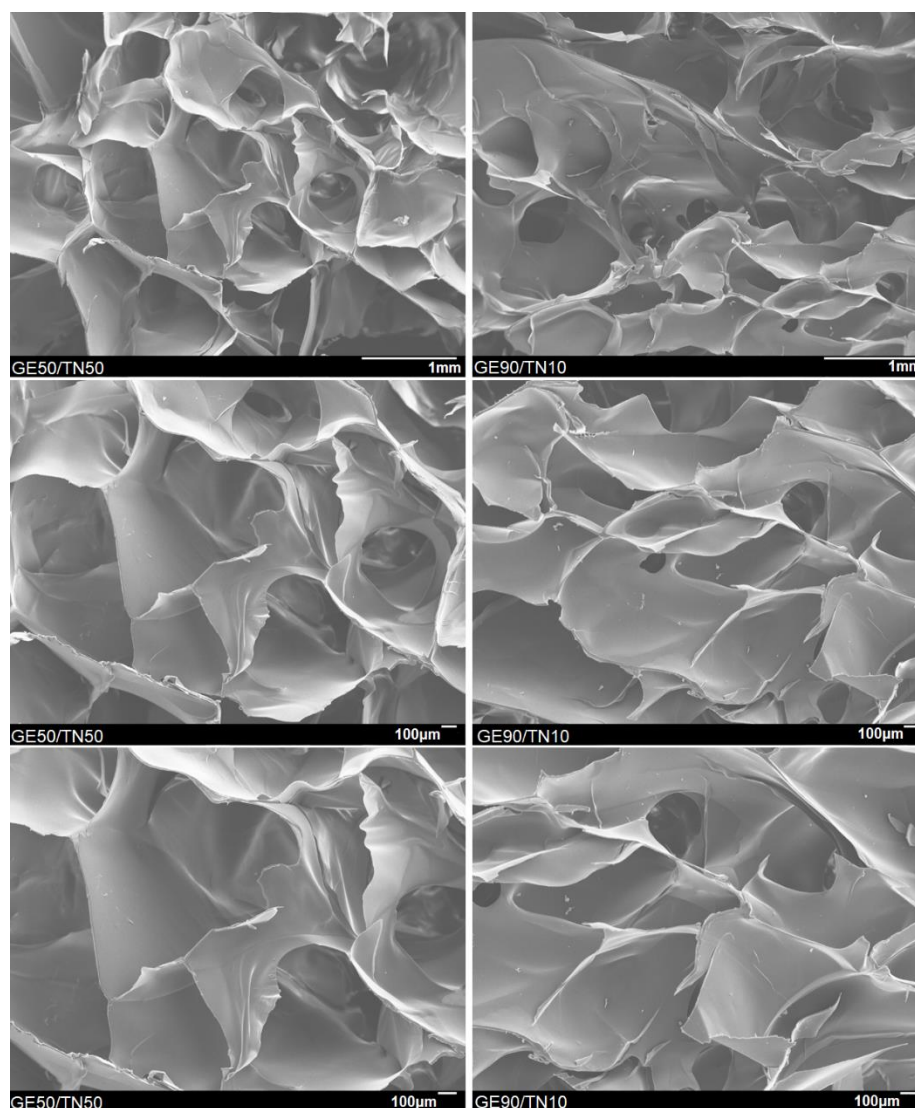
<sup>b</sup>Área do pico (aproximadamente em 401-402 eV) nos espectros XPS N1s de alta resolução (Fig. 18).

<sup>c</sup>Porcentagem relativa de  $-\text{NH}_3^+$  determinada a partir do conteúdo total de átomos de nitrogênio estimada pela área de cada pico do espectro XPS de alta resolução do envelope N1s (Fig. 18).

#### 5.4.4 Microscopia eletrônica de varredura

A Fig. 19 ilustra micrografias das secções transversais dos hidrogéis GE/TN obtidos por fratura. Os materiais apresentaram morfologia com poros interconectados com estruturas não homogêneas. Os poros estão distribuídos aleatoriamente na superfície dos hidrogéis e possuem morfologia irregular. Não foram observadas diferenças significativas de morfologia entre as amostras (Fig. 19). Resultados similares foram obtidos por **Lan et al., 2015**, onde desenvolveram compósitos porosos (esponjas) de GE/quitosana reticulados com ácido tânico. As micrografias das esponjas apresentaram uma morfologia com poros interconectados, distribuídos de forma uniforme. Em outro trabalho recentemente publicado pelo nosso grupo de pesquisa, **De Oliveira et al., 2019**, desenvolveram PECs de quitosana e goma gelana, em diferentes razões massa/massa. As micrografias dos hidrogéis obtidos na razão 50/50 apresentaram morfologia com estrutura frágil e não homogênea, sem poros definidos.





**Figura 19 – Micrografias das seções transversais (obtidas via fratura) dos hidrogéis GE50/TN50 e GE90/TN10 processados após liofilização.**

## 5.5 PROPRIEDADES DOS HIDROGÉIS GE/TN

### 5.5.1 Ensaio de desintegração e intumescimento

O excesso de GE desestabiliza a estrutura do hidrogel GE90/TN10, uma vez que este material não apresentou estabilidade em solução tampão PBS (pH 7,4). No entanto, o hidrogel GE50/TN50 exibiu estabilidade, pois manteve sua estrutura depois de 7 dias em contato com tampão PBS. Esse fato é confirmado por meio da análise de testes de desintegração, bem como, por meio da análise dos resultados de cultura de células, os quais ainda serão apresentados. Estes dados estão em acordo com os demonstrados obtidos por XPS. Por outro lado, para que o material possua

estabilidade, deve-se controlar a razão GE/TN (v/v) utilizada no preparo das blendas. A matriz do hidrogel GE50/TN50 ainda será aplicada como material *scaffold*. Além disso, ensaios antimicrobianos com os hidrogéis também serão investigados.

**Tabela 6 – Resultados de desintegração dos hidrogéis GE50/TN50 e GE90/TN10 em PBS (pH 7,4) e SGF (pH 1,2) obtidos de soluções GE a 4,0% m/v.**

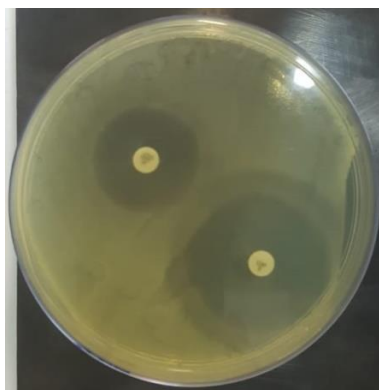
Amostras	Desintegração (%)		Desintegração (%)		Intumescimento	
	após 4 dias		após 7 dias			
	PBS	SGF	PBS	SGF	PBS	SGF
GE50/TN50	20,9	~100	24,7	*	1441	1773
GE90/TN10	~100	~100	*	*	*	*

\*Ensaio não realizado.

## 5.6 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS HIDROGÉIS GE/TN

### 5.5.1 Atividade antimicrobiana

O TN possui renomada atividade antimicrobiana (**FACCHI et al., 2017b**). Por isso, essa propriedade foi investigada, analisando a atividade antimicrobiana dos hidrogéis contra a bactéria *E. coli* em diferentes condições de pH (pH 6,0 e 7,4). As zonas de inibição formadas, foram comparadas com resultados obtidos por meio da aplicação de controles positivos, os quais apresentam atividade antimicrobiana contra *E. coli* (Fig. 20). Se faz uso do controle para comparar em termos de zona de inibição a atividade bactericida de um antibiótico em relação à atividade bactericida do hidrogel utilizado no presente estudo. Nesse caso, os controles positivos Gentamicina (GEN) e ciprofloxacina (CIP) promoveram halos de inibição de 21 e 32 mm, respectivamente.



**Figura 20 – Imagem digital da placa de cultura de *E. coli* contendo discos com os controles positivos, gentamicina (halo menor) e ciprofloxacina (halo maior).**

A *E. coli* foi selecionada para esse teste, uma vez que doenças tais como, infecções urinárias, diarreia e a colite hemorrágica ocorridas em humanos têm sido causada por esse microrganismo (**TINTINO et al., 2013**). A amostra GE50/TN50 não apresentou atividade bactericida contra a *E. coli*, ou seja, não houve formação de halo de inibição nos ensaios realizados em pH 6,0 e 7,4 (Fig.21). Porém, não houve crescimento de *E. coli* sobre os discos das amostras dos hidrogéis, inferindo que a amostra apresenta atividade bacteriostática. Outros testes devem ser realizados para confirmar essa propriedade. Além disso, para que ocorra halo de inibição, o hidrogel deve promover a liberação do TN, ou seja, o TN deve se difundir na placa de cultura. Apenas assim, o TN poderá entrar em contato com a *E. coli*. A amostra GE50/TN50 apresenta elevada estabilidade, portanto, não há liberação de TN a partir da amostra. Com isso não há halo de inibição promovido pelo hidrogel mais estável (Fig. 21).

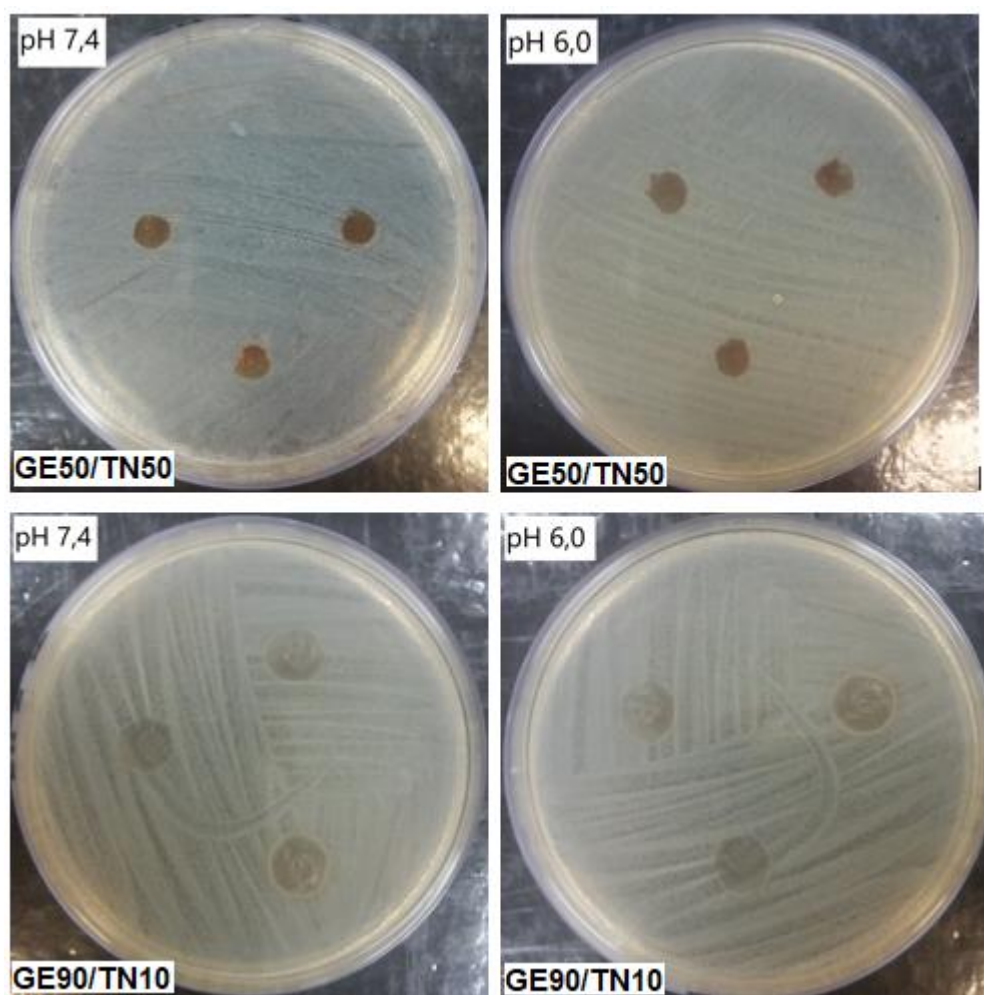


Figura 21 – Atividade antimicrobiana (em termos da formação de halo de inibição) promovidos por discos (6,0 mm) dos hidrogéis GE50/TN50 e GE90/TN10 contra *E. Coli* após 24 h de incubação a 37 °C.

Somente a amostra GE90/TN10 apresentou atividade bactericida contra *E. coli*. A Tabela 7, compara os halos de inibição promovido pelos discos dos hidrogéis e, também os resultados promovidos com os controles utilizados neste estudo.

Tabela 7 – Halos de inibição (mm) do hidrogel em comparação com dois antimicrobianos.

Controle: GEN	Controle: CIP	GE90/TN10 (pH 6,0)	GE90/TN10 (pH 7,4)
21	32	11	10

Os resultados corroboram com CLSI, 2012, para o diâmetro de halo obtido com a aplicação dos agentes antimicrobianos (controles positivos), onde o halo promovido pela GEN deve ocorrer entre 10 a 26 mm e para CIP em torno de 30 a 40 mm. A

bactéria pode ser classificada em sensível, moderadamente resistente ou resistente de acordo com o agente antimicrobiano utilizado (**MANTILLA et al., 2008**). Porém, o tamanho da zona de inibição promovida depende do microrganismo e, também da concentração do antibiótico.

A atividade antimicrobiana do hidrogel GE90/TN10 é devido à liberação de TN para o seio da placa de cultura, bem como devido ao conteúdo de GE no hidrogel. Conforme relatado anteriormente, o hidrogel GE90/TN10 apresentou baixa estabilidade em PBS (pH 7,4) em relação ao hidrogel GE50/TN50. Esta menor estabilidade promove degradação e liberação de TN da matriz dos hidrogel. O TN se difunde pela placa, promovendo ação bactericida sobre a *E. coli*. Esse efeito ocorre em ambos os pHs avaliados, uma vez que este hidrogel deve também apresentar baixa estabilidade em pH 6,0. Isso acontece devido ao grande excesso (98,7% em massa) de GE na estrutura do hidrogel GE90/TN10.

Os espectros de XPS de alta resolução do N1s indicaram a presença de grupos aminos protonados em ambos os hidrogéis GE50/TN50 e GE90/TN10. Desse modo, a interação eletrostática entre o TN catiônico e as membranas celulares das bactérias (carregadas negativamente), podem desestabilizar essas membranas, causando a morte dos microrganismos (**MARTINS et al., 2014**). Mas este resultado só ocorre com a amostra GE90/TN10, devido, possivelmente a liberação de TN da matriz do hidrogel. Por outro lado, esse mecanismo ajuda a explicar os resultados obtidos em pH 6,0.

Os mecanismos pelos quais os taninos exercem atividade antimicrobiana estão relacionados à inibição de enzimas microbianas extracelulares, privação dos substratos necessários para o crescimento microbiano e inibição da fosforilação oxidativa, que afeta o metabolismo microbiano (**SCALBERT, 1991**). Assim, para os resultados obtidos em pH 7,4, o modo de ação antimicrobiana pode estar relacionado à sua capacidade de inativar enzimas e proteínas transportadoras do invólucro celular (**COWAN, 1999**). Ninan e colaboradores, 2016, avaliaram a atividade antimicrobiana de hidrogéis *scaffolds* compostos de agarose carboxilada e ácido tânico contra *E. coli*. Os hidrogéis foram reticulados com íons zinco para a liberação de ácido tânico controlada pelo pH. O ensaio antibacteriano foi realizado através do método disco difusão em ágar. O diâmetro da zona de inibição promovida pelo hidrogel foi de 8 mm, enquanto que para o controle positivo (gentamicina) foi de 9 mm. Não foi observado zona de inibição no disco contendo o controle negativo (PBS). A atividade

antimicrobiana do TN contra a *E. coli* também foi relatado por **Facchi et al., (2017b)**, porém a atividade bactericida foi avaliada através de medidas de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (MBC), constatando a atividade antimicrobiana do TN. A amostra GE50/TN50 não apresentou atividade antimicrobiana devido à maior estabilidade desse hidrogel no meio de cultura, onde a *E. coli* foi cultivada.

### 5.5.2 Citocompatibilidade dos hidrogéis GE/TN

A citotoxicidade dos hidrogéis GE/TN foi avaliada por medidas de viabilidade celular via ensaio AlamarBlue (ou resazurina). A resazurina é um corante que é reduzido na presença de células viáveis. A redução muda a coloração do AlamarBlue de azul para rosa, permitindo a quantificação de células viáveis no meio de cultura, bem como a determinação da viabilidade celular por espectrofotometria (**DE FRIES e MITSUHASHI, 1995**). A intensidade de redução resultante depende do número de células vivas, ou seja, a porcentagem de redução do AlamarBlue é proporcional a porcentagem de células viáveis (**MARTINS et al., 2018a**).

Os resultados de viabilidade celular sobre as células BMSCs foram determinados via método AlamarBlue e estão apresentados na Fig. 22. Neste caso, os resultados de viabilidade celular promovidos pelos hidrogéis foram comparados com os resultados de viabilidade celular promovidos por um controle interno, tal como o metal titânio. Os ensaios foram realizados depois de 4 dias de análise e o titânio foi escolhido como controle interno devido ao seu amplo espectro de aplicações no campo biomédico. O titânio é um dos materiais mais utilizados na área biomédica em implantes dentários e ortopédicos, devido à sua excelente biocompatibilidade com os tecidos do corpo humano (**PIRES et al., 2015**).

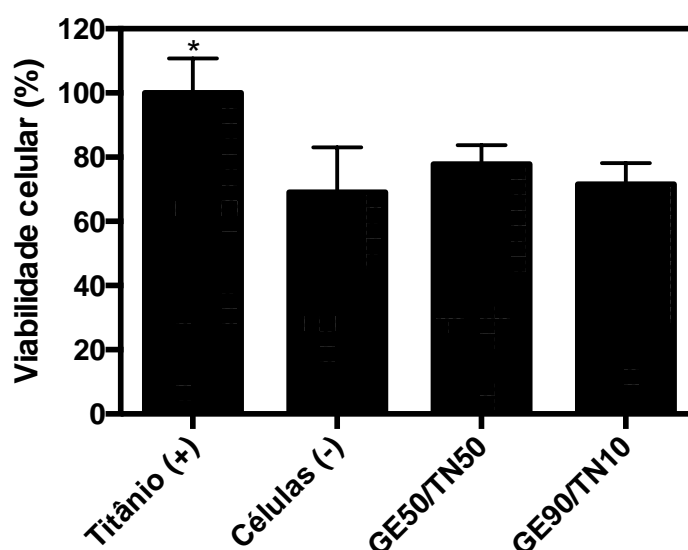


Figura 22 – Resultados de viabilidade celular promovidos pelas amostras GE/TN, titânio (controle positivo) e células (controle negativo) sobre células BMSCs depois de 4 dias de análise. O termo \* indica resultado significativamente diferente com  $p$  ao menos  $\leq 0,05$ .

Os resultados de viabilidade celular promovidos pelos hidrogéis foram normalizados em termos dos resultados de viabilidade promovidos pelo titânio. Assim, a viabilidade celular induzida pelo titânio foi tomada como sendo 100%. Neste caso, a viabilidade celular promovida pelos hidrogéis foi comparada com a viabilidade produzida pelo metal titânio (depois de 4 dias de análise). A amostra GE50/TN50 promoveu resultado de viabilidade celular de 78%, a amostra GE90/TN10 promoveu 71% e o controle negativo (meio de cultura contendo células, mas sem a presença de amostras), induziu 70% de viabilidade celular (Fig.22).

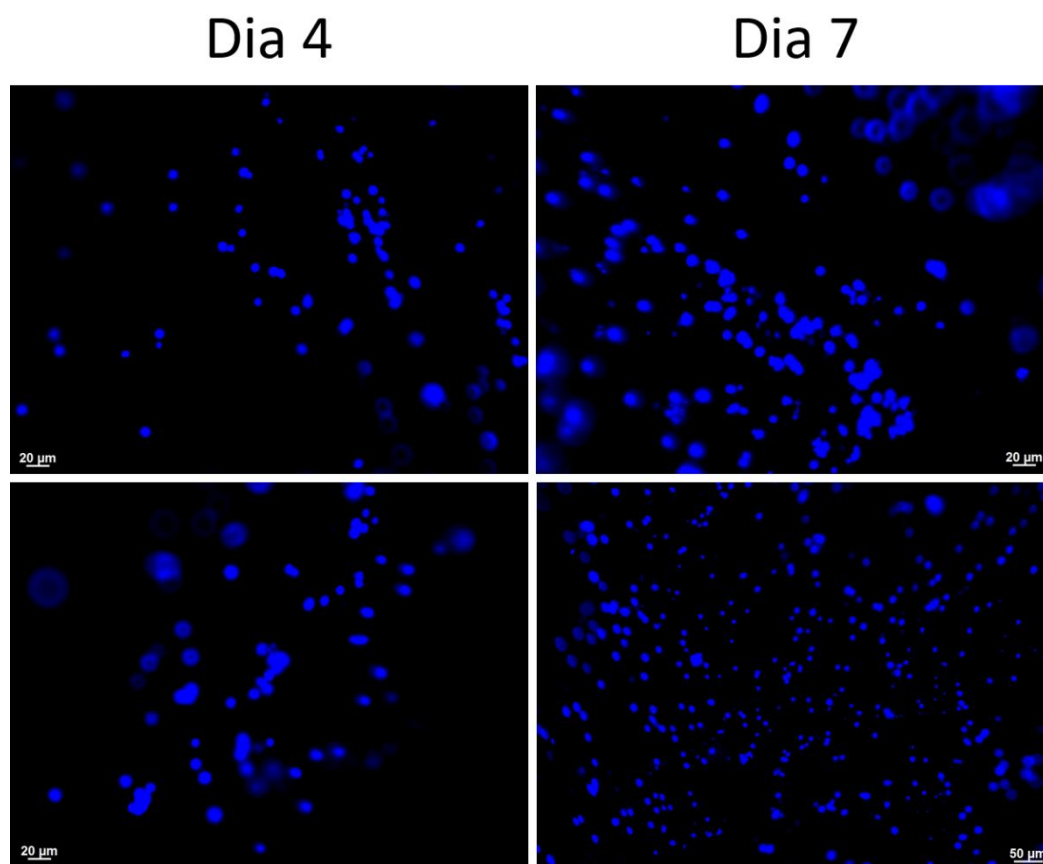
O titânio promove resultados significativamente diferentes, induzindo proliferação celular da BMSCs após 4 dias. As amostras são citocompatíveis, uma vez que os resultados de viabilidade celular promovido pelas amostras são próximo do valor de viabilidade determinado por meio do controle negativo. Nesse caso, as amostras não promovem efeitos citotóxicos sobre as células, mas também não induziram proliferação celular, tal como promoveu o titânio. Estes resultados estão em acordo com dados relatados na literatura. **Lan e colaboradores (2015)** desenvolveram compósitos porosos de quitosana/gelatina reticulados com ácido tânico para aplicação como agente hemostático (substância que estimula o processo que para o sangramento) cirúrgico absorvível. Os compósitos promoveram resultados de viabilidade celular superior a 80% sobre células fibroblastos após 24h quando comparadas com um controle negativo (realizado apenas com células e sem

amostras). **Martins et al., 2018a** recentemente, desenvolveram nanofibras de policaprolactona/TN para a obtenção de membranas *scaffolds*. As membranas apresentaram atividade antimicrobiana, citocompatibilidade e promoveram adesão e proliferação células ADSC depois de 7 dias em contato com as células. As membranas apresentaram viabilidade celular acima de 80% após 1 dia de cultura celular, quando comparadas a um controle negativo. Também há relatos de diversos trabalhos na literatura onde mostram que a GE tem uma boa citocompatibilidade (**SHIN, OLSEN e KHADEMHOSEINI, 2012; SIQUEIRA et al., 2015; WANG et al., 2012**). Aqui, o hidrogel GE50/TN50 de matriz estável foi citocompatível com as células BMSCs, podendo ser um candidato promissor para atuar como matriz *scaffold* na área de engenharia de tecidos. Já o hidrogel GE90/TN10 possui atividade antimicrobiana e também demonstrou ser citocompatibilidade. Esse material pode apresentar potencial para atuar como curativos de ferimentos, uma vez que, esse hidrogel bandagem pode proteger o ferimento contra deposição de bactérias sem promover efeito citotóxico ao corpo humano.

### 5.5.3 Adesão e proliferação de células

As células BMSCs foram cultivadas sobre a superfície do hidrogel GE50/TN50 (amostra estável em PBS). Depois de 4 e 7 dias de incubação, os resultados de adesão e proliferação celular sobre as células BMSCs foram determinados por meio de imagens de fluorescência e SEM (Figs. 23 e 24). O corante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) se liga preferencialmente a moléculas de DNA, indicando à presença do núcleo celular pela coloração azul característica que é emitida nas imagens de fluorescência (Fig. 23) (**SILVA, 2014**). A Fig. 23 ilustra as imagens de fluorescência dos núcleos celulares das BMSCs sobre a matriz da amostra GE50/TN50.





**Figura 23 –** Imagens de fluorescência da superfície do hidrogel GE50/TN50 contendo as BMSCs. As imagens foram obtidas após 4 e 7 dias de análise.

Após 7 dias, observou-se um número consideravelmente maior de núcleos celulares sobre a amostra GE50/TN50, ou seja, houve proliferação de células quando comparamos as imagens de fluorescência obtidas depois de 4 e 7 dias de incubação, indicando que o hidrogel possui propriedade *scaffold*. A Fig. 24 ilustra micrografias dos hidrogéis GE50/TN50 após 4 e 7 dias em contato com as células BMSCs. Após 4 dias, o hidrogel GE50/TN50 apresentou morfologia semelhante quando comparado à morfologia do material recém obtido (Fig. 19), confirmando que o hidrogel mantém sua estrutura tridimensional mesmo após estar em PBS por 7 dias de análise. Esta solução tampão simula o pH do sangue, isto é, a condição biológica dos organismos vivos. Após 4 dias, matriz do hidrogel promoveu a adesão celular de células BMSCs, assim como promoveu uma leve disseminação (espalhamento) de tais células em sua superfície. Por outro lado, após um maior período em PBS (após 7 dias), o hidrogel exibiu uma morfologia diferente em relação ao material recém obtido (Fig. 19). Após 7 dias, é perceptível a interação das BMSCs com a superfície do hidrogel. Essa interação promove espalhamento das células BMSCs sobre a amostra. Esse efeito é

perceptível na micrografia de escala 1  $\mu\text{m}$  obtida após 7 dias de cultura celular, a qual indica ocorrência de pequenas ramificações das BMSCs na superfície do material. Entretanto, o espalhamento não foi significativo. Possivelmente com mais dias de cultura, esse resultado seria mais satisfatório. Além disso, é possível ver outros tipos de células nas micrografias, como as hemácias, que são células sanguíneas. Sendo assim, as micrografias (Fig. 24) mostrou que o hidrogel atuou como matriz *scaffold*, promovendo a adesão, proliferação e leve disseminação de BMSCs em sua superfície.

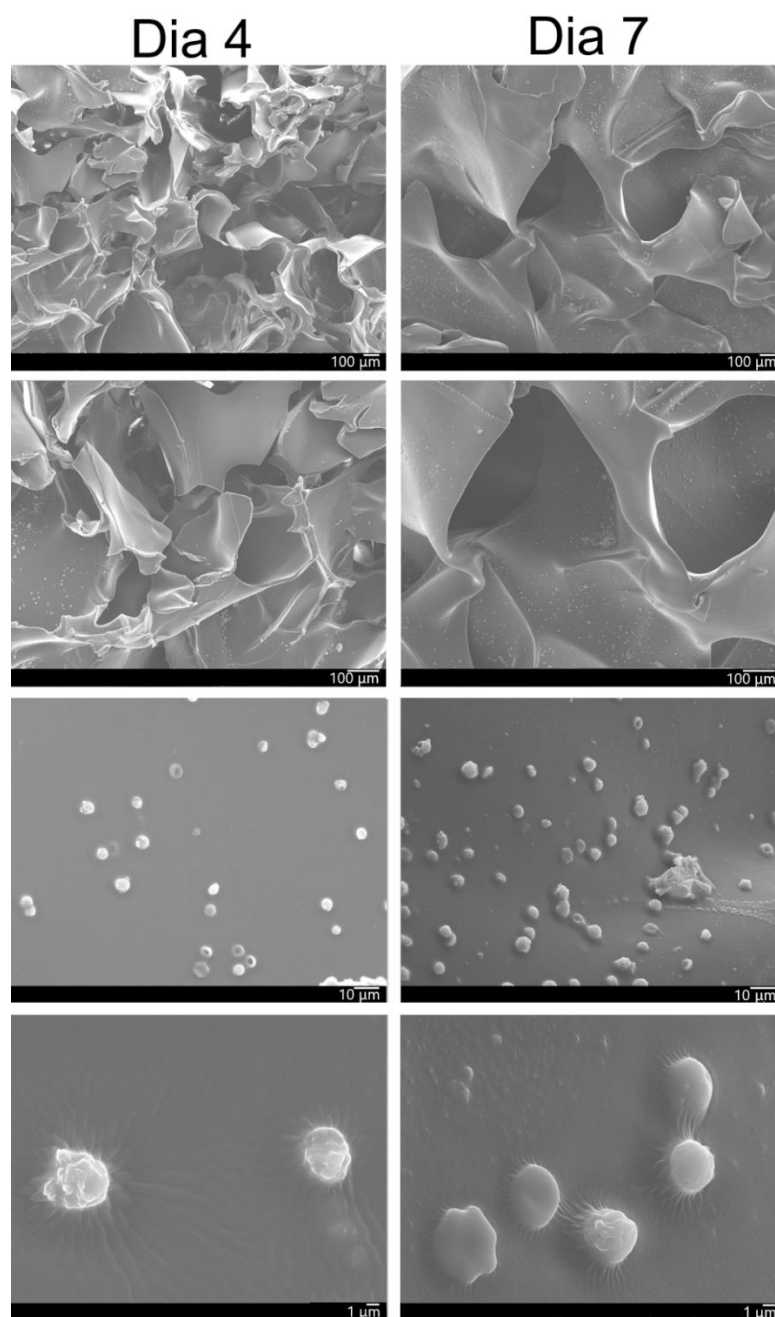


Figura 24 – Imagens SEM do hidrogel GE50/TN50 em contato com as células BMSCs após 4 e 7 dias de cultura celular.

Conforme relatado na seção anterior, **Martins et al., 2018a** desenvolveram nanofibras de PCL/TN para obtenção de membranas scaffolds. As membranas promoveram a adesão de células ADSC após 7 dias de cultura celular. Os resultados indicaram que aumentando o teor de TN na blenda confere melhor hidrofobicidade aos materiais, pois o TN contém grupos hidrofílicos  $-NH_2$  /  $-NH_3^+$  e  $-OH$  que podem interagir com a ECM para aumentar a ligação e a proliferação de células. Há diversos trabalhos na literatura sobre materiais a base de GE que apresentam propriedade de *scaffolds* (**BARADARAN-RAFII, BIAZAR e HEIDARI-KESHEL, 2015; GAUTAM, DINDA e MISHRA, 2013; LUO et al., 2015**).

## 6 CONCLUSÕES

Hidrogéis físicos e termossensíveis a base de gelatina (GE) e um derivado catiônico de taninos condensados (TN) foram obtidos pela primeira vez. Para isso, o TN deve ser previamente purificado para remoção de impurezas, principalmente íons cloreto e potássio. O processo de diálise propiciou remoção de oligômeros de TN e possibilitou formação de hidrogéis físicos pelo estabelecimento de blendas GE/TN a 50 °C. Além disso, as impurezas (pares iônicos) devem ser removidas da estrutura do TN para que se possa obter os hidrogéis. Após processo de diálise, o TN apresentou propriedades físico-químicas completamente diferentes (morfologia frágil e irregular, característica de polímeros naturais – taninos e polissacarídeos). Notou-se que todas as formulações apresentaram temperatura de gelificação ( $T_{\text{sol-gel}}$ ) na faixa de 40 a 42 °C. Esta propriedade é interessante, uma vez que, as  $T_{\text{sol-gel}}$  acontecem acima da temperatura do corpo humano (37 °C). Ensaio reológico evidenciaram que os hidrogéis preparados a partir de soluções GE a 4,0% m/v apresentaram comportamento de gel. As análises de FTIR e XPS indicaram a formação dos hidrogéis GE/TN. Os materiais demonstraram ter morfologia com poros interconectados, distribuídos aleatoriamente em suas estruturas irregulares. Controlando a razão GE/TN (v/v), bem como a concentração da solução GE utilizada no preparo de blendas, pode-se desenvolver uma hidrogel (GE50/TN50) com matriz estável quando em contato com tampão PBS. O hidrogel GE90/TN10 apresentou atividade bactericida, apresentando potencial para uma possível aplicação tópica como curativos. O hidrogel estável (GE50/TN50) se mostrou citocompatível com células BMSCs, promoveu a adesão e proliferação de tais células. Portanto, este hidrogel poderá atuar como matriz *scaffold* na área de engenharia de tecidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, C. N. et al. Microbial tannases: Advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 47–59, 2007.

AHEARNE, M.; YANG, Y.; LIU, K.-K. Mechanical Characterisation of Hydrogels for Tissue Engineering Applications. **Topics in Tissue Engineering**, v. 4, n. 12, p. 1–16, 2008.

AL-JABER, N. A.; AWAAD, A. S.; MOSES, J. E. Review on some antioxidant plants growing in Arab world. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 4, p. 293–307, 2011.

AL-NASIRY, S. et al. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1304–1309, 2007.

ALIHOSSEINI, F. Plant-based compounds for antimicrobial textiles. In: SUN, G. B. T.-A. T. (Ed.). **Woodhead Publishing Series in Textiles**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2016. p. 155–195.

ALMEIDA, J. F. DA S. L. **Preparação e caracterização de hidrogéis para aplicações biomédicas**. [s.l.] Universidade de Coimbra, 2 nov. 2010.

ANVARI, M.; CHUNG, D. Dynamic rheological and structural characterization of fish gelatin – Gum arabic coacervate gels cross-linked by tannic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 516–524, 1 out. 2016.

AOUADA, F. A. **Síntese e caracterização de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose para liberação controlada de pesticidas**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2009.

ARAÚJO, P. B. et al. Matrizes de quitosana/gelatina para liberação de Etonogestrel. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 12, n. 2, p. 138–145, 2017.

BARADARAN-RAFII, A.; BIAZAR, E.; HEIDARI-KESHEL, S. Cellular Response of Limbal Stem Cells on PHBV/Gelatin Nanofibrous Scaffold for Ocular Epithelial Regeneration. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 64, n. 17, p. 879–887, 2015.

BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J. Municipal wastewater treatment by modified tannin flocculant agent. **Desalination**, v. 249, n. 1, p. 353–358, 2009.

BRIGGS, D. Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy C. D. Wanger, W. M. Riggs, L. E. Davis, J. F. Moulder and G. E. Muilenberg Perkin-Elmer Corp., Physical Electronics Division, Eden Prairie, Minnesota, USA, 1979. 190 pp. \$195. **Surface and Interface Analysis**, v. 3, n. 4, p. v–v, 1981.

BRUSCHI, M. L. et al. Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: In Vitro Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 8, p. 2074–2089, 2007.

CAI, N. et al. Tailoring mechanical and antibacterial properties of chitosan/gelatin nanofiber membranes with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for potential wound dressing application. **Applied Surface Science**, v. 369, p. 492–500, 2016.

CLSI, C. AND L. S. I. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing; Approved standard M02-A11**, 2012.

COSTA, C. T. C. et al. Taninos e sua utilização em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 10, n. 4, p. 108–116, 2008.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 534–564, 1999.

CUI, L. et al. Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, n. 2, p. 31–38, 2014.

D'ALMEIDA, M. et al. Chitosan coating as an antibacterial surface for biomedical applications. **PLOS ONE**, v. 12, n. 12, p. e0189537, 13 dez. 2017.

DE FRIES, R.; MITSUHASHI, M. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: Comparison of alamarbluetm assay to 3h-thymidine incorporation assay. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 9, n. 2, p. 89–95, 1995.

DE OLIVEIRA, A. C. et al. Chitosan content modulates durability and structural homogeneity of chitosan-gellan gum assemblies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 114–123, 2019.

DE SOUZA COSTA-JÚNIOR, E.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 2, p. 553–561, 2009.

DE SOUZA FERREIRA, S. B. et al. Rheological, mucoadhesive and textural properties

of thermoresponsive polymer blends for biomedical applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 55, p. 164–178, 2015.

DE SOUZA FERREIRA, S. B. et al. The importance of the relationship between mechanical analyses and rheometry of mucoadhesive thermoresponsive polymeric materials for biomedical applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 74, p. 142–153, 2017.

DE VITERI, V. S.; FUENTES, E. Titanium and titanium alloys as biomaterials. In: **Tribology-Fundamentals and advancements**. [s.l.] InTech, 2013.

DILLE, M. J.; HATTREM, M. N.; DRAGET, K. I. Bioactively filled gelatin gels; challenges and opportunities. **Food Hydrocolloids**, v. 76, p. 17–29, 2018.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337–4351, 2003.

EDWARDS, C.; MARKS, R. Evaluation of biomechanical properties of human skin. **Clinics in Dermatology**, v. 13, n. 4, p. 375–380, 1995.

ENRIONE, J. et al. Edible Scaffolds Based on Non-Mammalian Biopolymers for Myoblast Growth. **Materials**, v. 10, n. 12, p. 1404, 2017.

FACCHI, D. P. et al. Polysaccharide-Based Materials Associated with or Coordinated to Gold Nanoparticles: Synthesis and Medical Application. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 25, 2017a.

FACCHI, D. P. et al. Polyelectrolyte complexes based on alginate/tanfloc: Optimization, characterization and medical application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 129–138, 2017b.

FLOREN, M. et al. Human mesenchymal stem cells cultured on silk hydrogels with variable stiffness and growth factor differentiate into mature smooth muscle cell phenotype. **Acta Biomaterialia**, v. 31, p. 156–166, 2016.

FUKAE, R. et al. Effect of stereoregularity and molecular weight on the mechanical properties of poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120, n. 1, p. 573–578, 2011.

GALLAGHER, W. FTIR analysis of protein structure. **Course manual Chem**, v. 455, 2009.

GAUTAM, S.; DINDA, A. K.; MISHRA, N. C. Fabrication and characterization of

PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 3, p. 1228–1235, 2013.

GEORGOPOULOU, A. et al. Chitosan/gelatin scaffolds support bone regeneration. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 5, p. 59, 2018.

GEROLA, A. P. et al. The effect of methacrylation on the behavior of Gum Arabic as pH-responsive matrix for colon-specific drug delivery. **European Polymer Journal**, v. 78, p. 326–339, 2016.

GRAHAM, N. et al. Characterisation and coagulation performance of a tannin-based cationic polymer: A preliminary assessment. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 327, n. 1–3, p. 9–16, 2008.

GUIL-GUERRERO, J. L. et al. Antimicrobial activity of plant-food by-products: A review focusing on the tropics. **Livestock Science**, v. 189, p. 32–49, 2016.

GULREZ, S. K. H.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. In: **Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications**. [s.l.] InTech, 2011.

HAEMA, K. et al. Radiation stability and modification of gelatin for biological and medical applications. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 103, p. 126–130, 2014.

HAMEED, Y. T. et al. A tannin-based agent for coagulation and flocculation of municipal wastewater: Chemical composition, performance assessment compared to Polyaluminum chloride, and application in a pilot plant. **Journal of Environmental Management**, v. 184, p. 494–503, 2016.

HELDT, H.-W.; PIECHULLA, B. Phenylpropanoids comprise a multitude of plant secondary metabolites and cell wall components. In: **Plant Biochemistry**. [s.l.] Academic Press, 2011. p. 431–449.

HOARE, T. R.; KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymer**, v. 49, n. 8, p. 1993–2007, 2008.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 18–23, 2012.

HUANG, X. et al. Preparation of platinum nanoparticles supported on bayberry tannin grafted silica bead and its catalytic properties in hydrogenation. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 320, n. 1–2, p. 40–46, 1 abr. 2010.



JEJURIKAR, A. et al. Degradable alginate hydrogels crosslinked by the macromolecular crosslinker alginate dialdehyde. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 19, p. 9751–9758, 2012.

JIANG, Q. et al. Ultrafine fibrous gelatin scaffolds with deep cell infiltration mimicking 3D ECMs for soft tissue repair. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 7, p. 1789–1800, 2014.

JIANG, Q.; REDDY, N.; YANG, Y. Cytocompatible cross-linking of electrospun zein fibers for the development of water-stable tissue engineering scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 10, p. 4042–4051, 2010.

KIRDPONPATTARA, S.; PHISALAPHONG, M.; KONGRUANG, S. Gelatin-bacterial cellulose composite sponges thermally cross-linked with glucose for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 177, p. 361–368, 2017.

KITI, K. et al. The potential use of gentamicin sulfate-loaded silk fibroin/gelatin blend scaffolds for wound dressing materials. **Polymer Bulletin**, v. 75, n. 6, p. 2543–2558, 2018.

KONG, J.; YU, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549–559, 2007.

KOSHY, S. T. et al. Click-Crosslinked Injectable Gelatin Hydrogels. **Advanced Healthcare Materials**, v. 5, n. 5, p. 541–547, 2016.

KULINETS, I. Biomaterials and their applications in medicine. In: **Regulatory Affairs for Biomaterials and Medical Devices**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2015. p. 1–10.

KURTIS KASPER F., M. S.; MIKOS, A. G. Chapter II.6.3 - Tissue Engineering Scaffolds. In: RATNER, B. D. et al. (Eds.). **Biomaterials Science (Third Edition)**. [s.l.] Academic Press, 2013. p. 1138–1159.

LAN, G. et al. Chitosan/gelatin composite sponge is an absorbable surgical hemostatic agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 1026–1034, 2015.

LI, Z.; GUAN, J. Hydrogels for cardiac tissue engineering. **Polymers**, v. 3, n. 2, p. 740–761, 2011.

LIU, H. et al. A study on a chitosan-gelatin-hyaluronic acid scaffold as artificial skin in vitro and its tissue engineering applications. **Journal of Biomaterials Science**,

**Polymer Edition**, v. 15, n. 1, p. 25–40, 2004.

LIU, M. et al. Chitosan-chitin nanocrystal composite scaffolds for tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 832–840, 2016.

LIU, X.; MA, P. X. Phase separation, pore structure, and properties of nanofibrous gelatin scaffolds. **Biomaterials**, v. 30, n. 25, p. 4094–4103, 2009.

LOH, Q. L.; CHOONG, C. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 19, n. 6, p. 485–502, 2013.

LUO, Y. et al. Concentrated gelatin/alginate composites for fabrication of predesigned scaffolds with a favorable cell response by 3D plotting. **RSC Advances**, v. 5, n. 54, p. 43480–43488, 2015.

MAILOA, M. N. et al. Antimicrobial activities of tannins extract from Guava leaves (*Psidium guajava* L) on pathogens microbial. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 3, n. 1, p. 236–241, 2014.

MANDAL, A. et al. Synthesis, characterization and comparison of antimicrobial activity of PEG/TritonX-100 capped silver nanoparticles on collagen scaffold. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 191–196, 2012.

MANGRICH, A. S. et al. Química verde no tratamento de águas: Uso de coagulante derivado de tanino de acácia mearnsii. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 2–15, 2014.

MANTILLA, S. P. S. et al. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp: isoladas de carne moída bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 2, p. 116, 2008.

MARK, H. F. **Encyclopedia of Polymer Science and Technology**. Third ed. [s.l.] Wiley, 2004.

MARTINS, A. et al. Antimicrobial Activity of Chitosan Derivatives Containing N-Quaternized Moieties in Its Backbone: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p. 20800–20832, nov. 2014.

MARTINS, A. F. et al. Shielding effect of “surface ion pairs” on physicochemical and bactericidal properties of N,N,N-trimethyl chitosan salts. **Carbohydrate Research**, v. 402, p. 252–260, 2015a.

MARTINS, A. F. et al. Polyelectrolyte complex containing silver nanoparticles with antitumor property on Caco-2 colon cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 748–755, 1 ago. 2015b.

MARTINS, A. F. et al. Novel poly( $\epsilon$ -caprolactone)/amino-functionalized tannin electrospun membranes as scaffolds for tissue engineering. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 525, p. 21–30, 2018a.

MARTINS, J. G. et al. Pectin-chitosan membrane scaffold imparts controlled stem cell adhesion and proliferation. **Carbohydrate Polymers**, v. 197, p. 47–56, 2018b.

MIGUEZ-PACHECO, V.; MISRA, S. K.; BOCCACCINI, A. R. Biodegradable and bioactive polymer/inorganic phase nanocomposites for bone tissue engineering (BTE). In: **Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers: Second Edition**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2014. p. 115–150.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Design Strategies of Tissue Engineering Scaffolds with Controlled Fiber Orientation. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 8, p. 1845–1866, 2007.

NASCIMENTO, M. H. M. DO et al. Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso. **Polímeros**, v. 26, n. 4, p. 360–370, 8 dez. 2016.

NEKLYUDOV, A. D. Nutritive Fibers of Animal Origin: Collagen and Its Fractions as Essential Components of New and Useful Food Products. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 229–238, 2003.

NG, W. L.; YEONG, W. Y.; NAING, M. W. Polyelectrolyte gelatin-chitosan hydrogel optimized for 3D bioprinting in skin tissue engineering. **International Journal of Bioprinting**, v. 2, n. 1, p. 53–62, 2016.

NINAN, N. et al. Antibacterial and Anti-Inflammatory pH-Responsive Tannic Acid-Carboxylated Agarose Composite Hydrogels for Wound Healing. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 42, p. 28511–28521, 2016.

OĆWIEJA, M.; ADAMCZYK, Z.; MORGA, M. Adsorption of tannic acid on polyelectrolyte monolayers determined in situ by streaming potential measurements. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 438, p. 249–258, 2015.

OKAMOTO, M.; JOHN, B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10–11, p. 1487–1503, 2013.

PANG, Z. et al. Rheology, texture and microstructure of gelatin gels with and without milk proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 484–493, 2014.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 1, p. 24–37, 2 set. 2010.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. [s.l.] Cengage Learning, 2010.

PINA, S.; OLIVEIRA, J. M.; REIS, R. L. Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review. **Advanced Materials**, v. 27, n. 7, p. 1143–1169, 2015.

PIRES, A. L. R. et al. BIOMATERIALS: TYPES, APPLICATIONS, AND MARKET. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

RAO, M. A. Rheological Behavior of Processed Fluid and Semisolid Foods. In: **Rheology of Fluid, Semisolid, and Solid Foods**. [s.l.] Springer, Boston, MA, 2014. p. 231–329.

ROCHA, A. M. et al. Prospecção De Artigos E Patentes Sobre Polímeros Biocompatíveis Aplicados À Engenharia De Tecidos E Medicina Regenerativa. **Cadernos de Prospecção**, v. 5, n. 2, p. 72–85, 2012.

ROMANI, A. et al. Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 2, p. 415–420, 2006.

ROMERO, R. et al. Coating cortical bone allografts with periosteum-mimetic scaffolds made of chitosan, trimethyl chitosan, and heparin. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 144–151, 2015.

ROSELLINI, E. et al. Protein/polysaccharide-based scaffolds mimicking native extracellular matrix for cardiac tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 106, n. 3, p. 769–781, mar. 2018.

SABIR, M. I.; XU, X.; LI, L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 21, p. 5713–5724, 2009.

SAHINER, N. et al. Biocompatible and biodegradable poly(Tannic Acid) hydrogel with antimicrobial and antioxidant properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 150–159, 2016.

SAHOO, N. et al. Recent advancement of gelatin nanoparticles in drug and vaccine delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 317–331, 2015.

SASAKI, S.; MURAKAMI, T.; SUZUKI, A. Frictional properties of physically cross-linked PVA hydrogels as artificial cartilage. **Biosurface and Biotribology**, v. 2, n. 1, p. 11–17, 2016.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875–3883, 1991.

SHIN, H.; OLSEN, B. D.; KHADEMHOSEINI, A. The mechanical properties and cytotoxicity of cell-laden double-network hydrogels based on photocrosslinkable gelatin and gellan gum biomacromolecules. **Biomaterials**, v. 33, n. 11, p. 3143–3152, 2012.

SILVA, L. H. A. DA. **Marcação de células-tronco mesenquimais com nanopartículas metálicas funcionalizadas com ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA)**. Brasília: Universidade Federal de Goiás, 2014.

SIQUEIRA, N. M. et al. Gelatin and galactomannan-based scaffolds: Characterization and potential for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 8–18, 2015.

SIVASHANMUGAM, A. et al. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 72, p. 543–565, 2015.

SMITH, A. M.; MOXON, S.; MORRIS, G. A. Biopolymers as wound healing materials. In: **Wound Healing Biomaterials**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2016. v. 2p. 261–287

SU, K.; WANG, C. Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 11, p. 2139–2145, 2015.

SULTANA, N. et al. Fabrication of gelatin scaffolds using thermally induced phase separation technique. **International Journal of Engineering, Transactions B: Applications**, v. 31, n. 8, p. 1302–1307, 2018.

TENTOR, F. R. et al. Scaffolds based on chitosan/pectin thermosensitive hydrogels containing gold nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 1186–1194, 2017.

THIELE, J. et al. 25th Anniversary Article: Designer Hydrogels for Cell Cultures: A Materials Selection Guide. **Advanced Materials**, v. 26, n. 1, p. 125–148, 2014.

TINTINO, S. R. et al. Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus cf . arabicus* sobre drogas antimicrobianas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, p. 157–162, 10 jun. 2013.

VAN VLIERBERGHE, S. et al. Porous hydrogel biomedical foam scaffolds for tissue repair. In: NETTI, P. A. B. T.-B. F. FOR T. E. A. (Ed.). **Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2014. p. 335–390.

VARGHESE, J. S.; CHELLAPPA, N.; FATHIMA, N. N. Gelatin-carrageenan hydrogels: Role of pore size distribution on drug delivery process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 346–351, jan. 2014.

VO, T. N. et al. Injectable dual-gelling cell-laden composite hydrogels for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 83, p. 1–11, 2016.

WANG, J. et al. Immobilization of gelatin on bacterial cellulose nanofibers surface via crosslinking technique. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 3, p. 536–541, 2012.

WANG, T.; TURHAN, M.; GUNASEKARAN, S. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan–poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer International**, v. 53, n. 7, p. 911–918, 2004.

WU, J.; MEREDITH, J. C. Assembly of Chitin Nanofibers into Porous Biomimetic Structures via Freeze Drying. **ACS Macro Letters**, v. 3, n. 2, p. 185–190, 2014.

XU, J. et al. Effect of aggregation behavior of gelatin in aqueous solution on the grafting density of gelatin modified with glycidol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 201–207, 2012.

YANG, H.; TAN, Q.; ZHAO, H. Progress in various crosslinking modification for acellular matrix. **Chinese medical journal**, v. 127, n. 17, p. 3156–64, 2014.

ZANDI, M.; MIRZADEH, H.; MAYER, C. Early stages of gelation in gelatin solution detected by dynamic oscillating rheology and nuclear magnetic spectroscopy. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 4, p. 1480–1486, 2007.

ZHA, Z. et al. Fabrication of gelatin nanofibrous scaffolds using ethanol/phosphate buffer saline as a benign solvent. **Biopolymers**, v. 97, n. 12, p. 1026–1036, 2012.

ZHU, J.; MARCHANT, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. **Expert Review of Medical Devices**, v. 8, n. 5, p. 607–626, 9 set. 2011.