

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

DÉBORA APARECIDA DE ALMEIDA

**SÍNTESE *in situ* DE NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA OBTENÇÃO DE
COMPÓSITOS COM POLISSACARÍDEOS VISANDO APLICAÇÕES
BIOMÉDICAS**

DISSERTAÇÃO

LONDRINA
2019

DÉBORA APARECIDA DE ALMEIDA

**SÍNTESE *in situ* DE NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA OBTENÇÃO DE
COMPÓSITOS COM POLISSACARÍDEOS VISANDO APLICAÇÕES
BIOMÉDICAS**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina, para obtenção do grau de “Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais”.

Orientador: Prof. Dr. Johny Paulo Monteiro.

Co-orientador: Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins.

LONDRINA

2019

TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



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

A447s Almeida, Débora Aparecida de
Síntese *in situ* de nanopartículas de ouro para obtenção de compósitos com polissacarídeos visando aplicações biomédicas / Débora Aparecida de Almeida. - Londrina : [s.n.], 2019.
75 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Johny Paulo Monteiro
Coorientador: Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.
Londrina, 2019.
Bibliografia: f. 64-69.

1. Nanocompósitos (Materiais). 2. Polissacarídeos. 3. Polímeros.
4. Biocompatibilidade. 5. Estabilidade. I. Monteiro, Johny Paulo, orient.
II. Martins, Alessandro Francisco, coorient. III. Universidade Tecnológica
Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais. V. Título.

CDD: 620.11

Ficha catalográfica elaborada por Cristina Benedeti Guilhem - CRB: 9/911



Ministério da Educação

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais (PPGCEM) - Campus Londrina



TERMO DE APROVAÇÃO

SÍNTESE *in situ* DE NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA OBTENÇÃO DE COMPÓSITOS COM POLISSACARÍDEOS VISANDO APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

por

DÉBORA APARECIDA DE ALMEIDA

Dissertação de mestrado apresentada no dia 05 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 (PPGCEM), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) - Campus Londrina. O Candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos Professores, conforme listado abaixo. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho **APROVADO**.

Prof. Dr. Johny Paulo Monteiro - Orientador
(UTFPR – Campus Apucarana)

Prof. Dr. Elton Guntendorfer Bonafé - Membro titular
(UTFPR – Campus Londrina)

Prof. Dr. Rafael da Silva - Membro titular
(UEL – Londrina)

Prof. Dr. Carlos Eduardo Cava
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais
(UTFPR – Campus Londrina)

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

Dedico este trabalho aos meus pais, Dora e Francisco, pelo apoio, amor, carinho e dedicação de toda uma vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, Agradeço a Deus, que me presenteou com oportunidades maravilhosas, dias incríveis e difíceis, e pessoas mais que especiais em minha vida. Por tudo isso, só posso dizer o meu mais sincero obrigada!

Ao meu pai Francisco e a minha mãe Dora, a quem eu serei eternamente grata, que sempre me incentivaram e apoiaram a seguir meus sonhos. Obrigada pelo amor e carinho, mas principalmente pelos valores ensinados. Amo vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Johny P. Monteiro, por toda a paciência, pela orientação, pela confiança, pelos ensinamentos, pelo profissionalismo e pela dedicação. Muito obrigada pela dicas e correções quando necessário sem nunca me desmotivar.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Alessandro F. Martins, pelo apoio, pelos materiais disponibilizados, pelo conhecimento científico, pela disponibilidade para sanar minhas dúvidas.

Aos meus colegas do PPGCEM, sou grata pela a oportunidade de convivência e conhecimentos trocados. Aos colegas e amigos do grupo de pesquisa La2MAC, da UTFPR-AP, pelo convívio, amizade e apoio demonstrado. Sou grata em especial aos meus amigos Fernanda, Ariel, Bruno, Jessica, Sharise e Joziel, pela amizade, pela preocupação, pelas risadas, pelo apoio constante e pelo companheirismo. Obrigada a todos.

Aos membros da banca, agradeço por aceitarem o convite de participação. Aos professores Sandro e Elton, pelos ensinamentos e dicas, e pelos materiais disponibilizados ao longo da realização deste trabalho.

Ao meu melhor amigo e namorado, Emerson de Oliveira Carvalho, que mesmo distante correndo atrás dos seus sonhos, está sempre ao meu lado e me apoiando a ir atrás dos meus. Sou grata pelo carinho, por entender os momentos de ausências e, principalmente, pela paciência.

Ao PPGCEM, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, e a Universidade Tecnológica Federal – Campus Apucarana e Londrina, pela oportunidade estar concluindo mais uma etapa. E aos professores do PPGCEM e funcionários da UTFPR-AP, que de alguma forma contribuiu diretamente ou indiretamente em minha formação, durante esses dois anos.

E a todos meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

ALMEIDA, Débora Aparecida de. **SÍNTESE *in situ* DE NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA OBTENÇÃO DE COMPÓSITOS COM POLISSACARÍDEOS VISANDO APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**. 2019. 75f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2019.

A produção de compósitos de polissacarídeos e nanopartículas de ouro (AuNPs) tem sido foco de muitas pesquisas atuais. Tem sido reportado que materiais dessa natureza exibem propriedades bactericidas e anti-carcinogênicas, além servir como matrizes para crescimento celular. Os polissacarídeos naturais, tais como quitosana e pectina, normalmente apresentam baixa citotoxicidade e são biocompatíveis. Sendo assim estão aptos para serem usados na produção de biomateriais. Além disso, tem sido amplamente reportado a obtenção de hidrogéis utilizando esses polissacarídeos. Os hidrogéis de quitosana e pectina podem ser excelentes matrizes para AuNPs pois suas cadeias arranjadas tridimensionalmente exibem grupos capazes de executar a síntese *in situ* assim como fornecer um ambiente estável para o nanomaterial. Com base nisso, o presente trabalho propõe um método simples para obtenção de compósitos de pectina-AuNPs/quitosana a qual foi testado como matriz para crescimento celular. Inicialmente foi realizada a síntese *in situ* de AuNPs em solução de pectina por meio da mistura do precursor de ouro (HAuCl₄) com o polissacarídeo sob aquecimento a 65°C. Diferentes concentrações de soluções de polissacarídeo e HAuCl₄ foram testadas. Em seguida, hidrogéis de pectina-AuNPs e quitosana 1% (m/v), diluída em HCl 0,1 mol.L⁻¹, foram obtidos também a 65°C. As AuNPs em pectina foram caracterizadas por espectroscopia visível, a qual foi verificado aparecimento de bandas características de ressonância de plasmon de superfície localizado para AuNPs. Os compósitos foram caracterizados por meio de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS), difração de raio-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ponto de carga zero (pH_{pzc}), as quais comprovaram sua obtenção. Sob ensaio de desintegração/degradação em PBS, foi observado que a conjugação de pectina com quitosana permitiu a obtenção de hidrogéis estáveis na proporção 60:40 (pectina:quitosana), se empregada solução de pectina 2,5% (m/v) com e sem AuNPs inclusas na matriz 3D. Os hidrogéis sem adição HAuCl₄ apresentou intumescimento em

torno 4500%. Os compósitos tiveram intumescimento de aproximadamente 3000%, quando a maior quantidade de precursor de ouro foi testada. A presença de AuNPs fizeram os hidrogéis mais rígidos. Testes de crescimento celular mostraram que o compósito apresentou 84% de viabilidade celular para células ADSCs em comparação com controle positivo (placa de titânio). Isso indica que o material produzido apresenta propriedades favoráveis para aplicação na área biomédica de renovação tecidual. Vale ressaltar que o caminho de obtenção do compósito, considerando a síntese *in situ* de AuNPs em pectina seguida da conjugação com quitosana, ainda não tem sido reportada na literatura.

Palavras-chave: Hidrogéis. Complexos polieletrólitos. Estabilidade. Citocompatibilidade. Viabilidade Celular. Nanocompósitos.

ABSTRACT

ALMEIDA, Débora Aparecida de. **SYNTHESIS *in situ* OF GOLD NANOPARTICLES FOR OBTAINING COMPOSITES WITH POLYSACCHARIDES VISUALIZING BIOMEDICAL APPLICATIONS.** 2019. 75f. Master degree - Post-Graduate Program in Materials Science and Engineering, Federal Technological University of Paraná. Londrina, 2019.

The composites production based on polysaccharide and gold nanoparticles (AuNPs) has been the focus of many current research. It has been reported that the materials of this nature has bactericidal and anti-carcinogenic properties, besides serving as matrices for cell growth. Natural polysaccharides, such as chitosan and pectin, usually exhibit low cytotoxicity and are biocompatible. Then, they are suitable for use in the production of biomaterials. In addition, the hydrogels obtainment with these polysaccharides has been widely reported. The pectin/chitosan hydrogels can be excellent matrices for AuNPs because their 3D-organized chains can be able to perform an *in situ* synthesis as well as provide a stable environment for the nanomaterial. Based on this, the present work is a simple method to obtain pectin-AuNPs/chitosan composites, which was tested as a matrix for cell growth. Initially, it was an *in situ* synthesis of AuNPs in pectin solution by mixing the gold precursor (HAuCl_4) with the polysaccharide under heat at 65°C . Different concentrations of polysaccharide and HAuCl_4 solutions were tested. Then, pectin-AuNPs hydrogels and 1% (w/v) chitosan, diluted in $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ HCl, were also obtained at 65°C . As the pectin AuNPs were characterized by spectroscopy, surface resonance bands localized to AuNPs were highlighted. The compounds were characterized by infrared spectroscopy (FTIR), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and zero charge point (pH_{pzc}), as companies have proven their success. The disintegration assay by injection in PBS showed that the pectin-AuNPs/chitosan association allowed the production of stable hydrogels in the ratio 60:40 pectin-AuNPs:chitosan (B0 and B3), when pectin 2,5% (w/v) and 1% (w/v) chitosan solutions were used with and without AuNPs included in the 3D matrix. The hydrogels, without the addition of HAuCl_4 (B0), showed swelling around 4500%. The composites had approximately 3000%, when the largest amount of gold precursor was tested. The presence of AuNPs made the hydrogels more rigid. Cell growth tests showed that the composite presented 84% cell viability for ADSC cells compared to positive control

(titanium plate). This indicates that the material produced has favorable properties for application in the biomedical area of tissue renewal. It is noteworthy that the path of obtaining the composite, considering the *in situ* synthesis of AuNPs in pectin followed by conjugation with chitosan, has not yet been reported in the literature.

Keywords: Hydrogels. Complex polyelectrolytes. Stability. Cytocompatibility. Cell viability. Nanocomposite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de LSPR em AuNPs.....	23
Figura 2. (A) Soluções de nanopartículas de ouro esféricas com diferentes diâmetros e (B) os respectivos espectros de absorção.	24
Figura 3. Exemplos de alguns métodos de síntese utilizados para obtenção de AuNPs.	24
Figura 4. Representação esquemática da estrutura química da pectina, sendo constituída de (A) ácido D-galacturônico e (B) ácido D-galacturônico metoxilado.	26
Figura 5. Representação esquemática da estrutura química da quitosana.....	27
Figura 6. Espectros no visível de AuNPs em pectina 2,25% (m/v). Sendo: A1 com 1×10^{-4} mol.L ⁻¹ , A2 com 2×10^{-4} mol.L ⁻¹ e A3 com 3×10^{-4} mol.L ⁻¹ de HAuCl ₄ . Inserção: imagens fotográficas das suspensões coloidais obtidas para as diferentes condições de síntese testadas.	40
Figura 7. Espectros no visível de AuNPs em pectina 2,50% (m/v). Sendo: B1 com 1×10^{-4} mol.L ⁻¹ , B2 com 2×10^{-4} mol.L ⁻¹ e B3 com 3×10^{-4} mol.L ⁻¹ de HAuCl ₄ . Inserção: imagens fotográficas das suspensões coloidais obtidas para as diferentes condições de síntese testadas.	40
Figura 8. Espectros no visível de AuNPs em pectina 2,75% (m/v). Sendo: C1 com 1×10^{-4} mol.L ⁻¹ , C2 com 2×10^{-4} mol.L ⁻¹ e C3 com 3×10^{-4} mol.L ⁻¹ de HAuCl ₄ . Inserção: imagens fotográficas das suspensões coloidais obtidas para as diferentes condições de síntese testadas.	41
Figura 9. Imagens digitais dos compósitos de Pectina-AuNPs/Quitosana obtidos a partir de soluções nas concentrações propostas pela Tabela 1, onde: A é referente a 2,25% (m/v), B) 2,5% (m/v) e, C) 2,75% (m/v) de pectina, sendo todos obtidos com solução de quitosana 1% (m/v).....	44
Figura 10. Micrografias de MEV da superfície dos compósitos a base de Pectina-AuNPs/Quitosana (em magnificação de 2.000x). Em (A) compósitos contendo 2,25% (m/v) e 1% (m/v) de quitosana, (B) compósitos contendo 2,5% (m/v) e 1% (m/v) de quitosana e (C) compósitos contendo 2,75% (m/v) e 1% (m/v) de quitosana. A numeração crescente indica: (0) não há adição de HAuCl ₄ , (1) possui 1×10^{-4} mol.L ⁻¹ , (2) possui 2×10^{-4} mol.L ⁻¹ e (3) possui 3×10^{-4} mol.L ⁻¹ de HAuCl ₄	46

Figura 11. Micrografias de MEV da superfície dos compósitos com a presença de AuNPs em A2 (magnificação 25.000x) e A1 (magnificação 20.000x). Sendo que: A2 possui 2×10^{-4} mol.L ⁻¹ e A1 possui 1×10^{-4} mol.L ⁻¹ de HAuCl ₄	46
Figura 12. Espectros de varredura XPS dos compósitos contendo (A) 2,25%, (B) 2,5% e (c) 2,75% (m/v) de pectina. Todas amostras preparadas em solução 1% (m/v) de quitosana. A numeração situada na frente indica: (0) não há adição, (1) possui 1×10^{-4} mol.L ⁻¹ , (2) possui 2×10^{-4} mol.L ⁻¹ e (3) possui 3×10^{-4} mol.L ⁻¹ de HAuCl ₄	47
Figura 13. Espectros XPS de alta resolução para níveis de Au4f na amostra A3.	48
Figura 14. Espectros de FTIR-KBr dos compósitos contendo (A) 2,5% e (B) 2,75% (m/v) de pectina com/sem diferentes concentrações de HAuCl ₄ e 1% (m/v) de quitosana. Sendo: B0 e C0 não há adição de HAuCl ₄ , B1 e C1 possui 1×10^{-4} mol.L ⁻¹ , B2 e C2 possui 2×10^{-4} mol.L ⁻¹ e, B3 e C3 possui 3×10^{-4} mol.L ⁻¹ de HAuCl ₄	50
Figura 15. Perfis de DRX para os compósitos com 2,5% (m/v) de pectina e 1% (m/v) de quitosana. Onde: (B0) não há adição de HAuCl ₄ , (B1) 1×10^{-4} mol.L ⁻¹ , (B2) 2×10^{-4} mol.L ⁻¹ e (B3) 3×10^{-4} mol.L ⁻¹ de HAuCl ₄	52
Figura 16. Grau de intumescimento (GI%) dos compósitos de pectina-AuNPs/quitosana avaliados em PBS (pH = 7,4) por 24 h, a 37°C. Sendo que: B0 e C0 não há adição de HAuCl ₄ , B3 e C3 possui 3×10^{-4} mol.L ⁻¹ de HAuCl ₄ . Resultados significativamente diferentes implicam $p \leq 0,01$ (**) e $p \leq 0,05$ (*).	53
Figura 17. Desintegração (%) dos compósitos de Pectina-AuNPs/Quitosana avaliados em PBS por 14 dias. Sendo que: B0 e C0 não há adição de HAuCl ₄ , B3 e C3 possui 3×10^{-4} mol.L ⁻¹ de HAuCl ₄ . Resultados significativamente diferentes implicam $p \leq 0,05$ (*). 54	
Figura 18. Resultado da determinação do pH _{pzc} para os compósitos de Pectina-AuNPs/Quitosana avaliados por 24 horas. Sendo que: B0 e C0 não há adição de HAuCl ₄ , B3 e C3 possui 3×10^{-4} mol.L ⁻¹	55
Figura 19. Resultados de viabilidade celular promovidos pelos compósitos em comparação com A) controle negativo (células) e B) controle positivo (titânio), sobre células ADSCs após 4 dias de análise. Sendo que: B0 não há adição de HAuCl ₄ , B1 1×10^{-4} mol.L ⁻¹ e, B3 e C3 3×10^{-4} mol.L ⁻¹ de HAuCl ₄ . Os termos *, **, *** e **** indicam resultados significativamente diferentes com $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$	56
Figura 20. Imagens fotográficas das amostras de estudo de estabilidade de AuNPs em diferentes meios para A) 0 dia (dia da síntese), B) após 60 dias, sob 25°C e C) após 60 dias, sob 5°C.	60

Figura 21. Espectros do visível de AuNPs sintetizadas pelo método de (A) Turkevich e por (B) Pectina, e a presença (F) na matriz do compósito mostrando estabilidade em função do tempo em dias no armazenamento de 5°C e 25°C..... 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições estudadas para formação de hidrogéis de pectina e quitosana.....	30
Tabela 2. Condições experimentais usadas para a produção compósitos de pectina-AuNPs/quitosana.	32
Tabela 3. Condições de síntese, razão mássica dos polissacarídeos e avaliação da ocorrência ou não da formação de hidrogéis de pectina/quitosana.	42
Tabela 4. Número de onda (cm^{-1}) e atribuições de grupos funcionais na superfícies dos compósitos.....	51
Tabela 5. Temperatura e tempo necessários para atingir a transição de fase sol-gel dos compósitos, com 2,5% (m/v) de pectina e 1% (m/v) de quitosana. Onde: (B0) não há adição de HAuCl_4 , (B1) $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, (B2) $2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e (B3) $3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de HAuCl_4	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Redes tridimensionais
AB%	AlarmBlue
ADSCs	Células-Tronco derivadas de tecido adiposo humano (do inglês, <i>Human adipose-derived stem cells</i>)
ANOVA	Análise de variância
AuNPs	Nanopartículas de ouro
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (do inglês, <i>Dulbecco's modified eagle médium</i>)
DRX	Difração de raio-X
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho (do inglês, <i>Infrared spectroscopy</i>)
GI	Grau de intumescimento
LSPR	Ressonância de plasmon de superfície localizada (do inglês, <i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PBS	Tampão fosfato (do inglês, <i>Phosphate-saline buffer</i>)
PECs	Complexos Polieletrólíticos (do inglês, <i>Polyelectrolyte complexes</i>)
pHpcz	Ponto de carga zero
SPP	Poláritons de plasmon de superfície (do inglês, <i>surface plasmon polaritons</i>)
UV	Ultravioleta
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (do inglês, <i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
3.1	COMPÓSITOS DE HIDROGEIS E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	21
3.2	NANOPARTÍCULAS DE OURO	22
3.2.1	Síntese de Nanopartículas de Ouro	24
3.3	POLISSACARÍDEOS	25
3.3.1	Pectina	26
3.3.2	Quitosana	27
3.4	HIDROGEL PECTINA/QUITOSANA	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	MATERIAIS	30
4.2	METODOLOGIA	30
4.2.1	Síntese de hidrogéis de pectina/quitosana	30
4.2.2	Síntese de AuNPs <i>in situ</i> em Pectina	31
4.2.3	Produção de Compósitos de Pectina-AuNPs/Quitosana	32
4.3	CARACTERIZAÇÃO	32
4.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	33
4.3.2	Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (X-ray Photoelectron Spectroscopy - XPS)	33
4.3.3	Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)	33
4.3.4	Grau de Intumescimento (GI).....	34
4.3.5	Ensaio de Desintegração/Degradação	34
4.3.6	Ponto de Carga Zero (pH _{pzc}).....	35
4.3.7	Difração de Raio-X (DRX)	35
4.4	ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR	35
4.4.1	Cultura de células	35
4.4.2	Ensaio de citocompatibilidade <i>via</i> método AlamarBlue	36
4.5	TERMOSENSIBILIDADE.....	37
4.6	ESTUDO DE ESTABILIDADE DA SUSPENSÃO COLOIDAL DE AuNPs....	37
4.6.1	Síntese de AuNPs pelo Método de Turkevich.....	37
4.6.2	Estudo de estabilidade das suspensões coloidais de Nanopartículas de Ouro .	38

5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5.1	SÍNTESE DE AuNPs <i>in situ</i> EM PECTINA	39
5.2	OBTENÇÃO DOS HIDROGÉIS DE PECTINA/QUITOSANA E DOS COMPÓSITOS PECTINA-AuNPs/QUITOSANA	41
5.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	44
5.4	ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS-X (X-RAY PHOTOELECTRON SPECTROSCOPY - XPS)	46
5.5	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR - KBr)	49
5.6	DIFRAÇÃO DE RAIO-X (DRX)	51
5.7	GRAU DE INTUMESCIMENTO (GI)	52
5.8	DESINTEGRAÇÃO DOS COMPÓSITOS	53
5.9	PONTO DE CARGA ZERO (pH _{pcz})	55
5.10	ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR	56
5.11	TERMOSENSIBILIDADE	58
5.12	ESTUDO DE ESTABILIDADE	59
6	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
	APÊNDICE A	70
	APÊNDICE B	72
	APÊNDICE C	74

1 INTRODUÇÃO

A produção de compósitos de hidrogéis e nanopartículas metálicas têm sido atualmente utilizados para o desenvolvimento de biomateriais com importantes aplicações na área médica (REN, 2016). A presença de nanopartículas na estrutura tridimensional é responsável por incorporar novas características aos materiais e torná-los interessantes para as mais diversas aplicações. Dentre os metais aplicados, as nanopartículas de ouro (AuNPs) apresentam propriedades físico-químicas distintas como a elevada inércia e biocompatibilidade (NOLAN et al., 2018), além de propriedades ópticas destacadas que estão relacionadas com o efeito de ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR, do inglês *Localized Surface Plasmon Resonance*). Por sua vez, as características da LSPR são dependentes do raio, da distribuição de tamanhos, forma entre outros aspectos do nanomaterial. Por esses motivos, as AuNPs têm atraído o foco de pesquisas de sensoriamento eletrônico, dispositivos ópticos e na área biomédica, ambiental e cosméticas (ANA HUERGO et al., 2018).

A aplicação das AuNPs depende da manutenção de sua estabilidade no meio de aplicação por longos períodos de tempo, sem perdas em suas propriedades estruturais e físico-químicas. Por serem termodinamicamente instáveis, devido à grande razão superfície/volume, possuem a tendência natural de aglomeração (ASLAN; PÉREZ-LUNA, 2002). Assim, estudos buscam métodos de síntese capazes de oferecer estabilização química em diferentes meios e que ainda possam ser adaptados para oferecer formas e tamanhos diferentes. Isso propicia explorar um leque maior de propriedades de nanopartículas relacionadas com a mudança desses aspectos.

O método tradicional de síntese das nanopartículas metálicas, envolve tratamento de uma solução contendo sais metálicos com um agente redutor químico. Muitos agentes redutores podem causar toxicidade ambiental e/ou geração de resíduos nocivos ao ambiente ou para saúde humana (SHUKLA et al., 2012). Isso pode comprometer qualquer possibilidade de aplicação biomédica. Como alternativa para minimizar ou eliminação desses inconvenientes, tem-se estudado reações de redução de sais metálicos por processos *in situ* ou por síntese verde. Isso pode ser alcançado com a utilização de macromoléculas, como polissacarídeos naturais, as quais conseguem agir simultaneamente como agente redutor e estabilizador da suspensão coloidal de nanopartículas. Isso torna o processo de redução econômico (menor número de etapas e

menor gasto com reagentes químicos), simples, eficaz e ecologicamente correto (HUANG; YANG, 2004; YULIZAR et al., 2017).

Os polissacarídeos naturais possuem cadeias longas apresentando diversos grupos funcionais como hidroxilas, extremidades de hemiacetais, aminas, entre outros, as quais desempenham papéis vitais na redução e na estabilização de AuNPs (DEVENDIRAN et al., 2016). A pectina (polissacarídeo aniônico, dependendo do pH) e quitosana (polissacarídeo catiônico, dependendo do pH), como exemplos, também possuem propriedades biológicas destacadas tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa citotoxicidade. Esses polissacarídeos ainda podem ser combinados para gerar um complexo polieletrólítico que apresenta estrutura tridimensional (hidrogéis) estáveis devido às interações eletrostática e intermolecular (como as ligações de hidrogênio, por exemplo) que ocorrem entre os polissacarídeos (NEUFELD; BIANCO-PELED, 2017). Essas estruturas 3D são úteis como meio de encapsulamento de AuNPs.

Já tem sido reportado trabalhos onde as nanopartículas metálicas foram obtidas com auxílio de agente redutores (como borohidreto de sódio, ácido ascórbico ou a foto-irradiação) e depois incorporadas nas matrizes de hidrogéis, o que pode induzir a citotoxicidade do compósito final (LI; ZHAO; ASTRUC, 2014; CORDEIRO et al., 2016). Porém, a obtenção de nanopartículas *in situ* diretamente nos hidrogéis podem reduzir aglomerações indesejadas e escape de nanopartículas durante a sua aplicação (THI et al., 2018). Isso permite obter compósitos de fácil reprodutibilidade, alta estabilidade de nanopartículas e de baixa citotoxicidade.

A aplicação de hidrogéis contendo nanopartículas metálicas *in situ* em sua matriz, mostra-se promissor para inúmeras utilizações. Como exemplo, Ribeiro e colaboradores reportaram a obtenção de hidrogéis de fibroína bacteriana/nanohidroxiapatita contendo nanopartículas de ouro e prata produzidas *in situ*, as quais puderam ser efetivamente utilizados como materiais antimicrobiano sem o comprometimento do comportamento celular (RIBEIRO et al., 2017). Por outro lado, a produção de hidrogéis de quitosana com nanopartículas de ouro *in situ*, eletricamente condutivas, demonstra o potencial como *scaffolds* para regeneração de tecido miocárdico (BAEI et al., 2016).

Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi sintetizar nanopartículas de ouro *in situ* em altas concentrações de pectina com alto grau metoxilação. Além disso, em conjunto com a reticulação física de hidrogéis contendo pectina-AuNPs/quitosana. Esse

novo material (compósito) poderá ser aplicado como uma matriz *scaffolds* para crescimento de células ADSCs. Essas células tronco são relacionadas com o desenvolvimento de tecido adiposo e bastante aplicadas em medicina regenerativa e terapia celular (SIMONACCI; BERTOZZI; RAPOSIO, 2017; ZHANG et al., 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter nanopartículas de ouro sintetizar *in situ* por pectina e produzir compósitos à base de polissacarídeos (pectina-AuNPs/quitosana) visando a produção de material *scaffolds* para crescimento celular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar AuNPs *in situ* em pectina com alto grau de metoxilação;
- Empregar diferentes concentrações de H₂AuCl₄ na síntese de AuNPs em pectina;
- Caracterizar a formação de AuNPs por espectroscopia visível;
- Produzir compósito (hidrogel) de pectina-AuNPs e quitosana;
- Caracterizar o compósito obtido por espectroscopia na região de infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS), difração de raio-X (DRX) e potencial de carga zero (pH_{pzc});
- Obter o grau de intumescimento e avaliar o ensaio de desintegração em solução tampão de fosfato (PBS) para os compósitos de hidrogéis de pectina-AuNPs/quitosana;
- Realizar e avaliar o ensaio da citocompatibilidade *in vitro* dos compósitos de hidrogéis de pectina-AuNPs/quitosana;
- Comparar a estabilidade das AuNPs ao longo do tempo (90 dias) no hidrogel, sintetizadas na pectina e pelo método convencional de Turkevitch.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 COMPÓSITOS DE HIDROGEIS E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Nos últimos anos a classe de materiais inteligentes baseados em compósitos de hidrogéis (redes de polímeros reticulados na presença de nanopartículas ou nanoestruturas) atraíram interesse das mais diversas áreas (REN, 2016). Dentre essas, a área biomédica tem se destacado. Isso ocorre pois os hidrogéis possuem propriedades tais como: porosidade, capacidade de absorção de água e propriedades mecânicas que tem favorecido o desenvolvimento de biomateriais para esse fim. Estudos têm mostrado que os compósitos são excelentes candidatos para liberação de fármacos, suporte para adesão e proliferação celular, e na engenharia de tecidos (FACCHI et al., 2017).

Segundo Wahid et al. (2017), a incorporação das nanopartículas metálicas na matriz de hidrogéis, pode ser alcançada através de cinco principais métodos. O primeiro é denominado formação de hidrogéis em suspensão de nanopartículas, método simples, onde as nanopartículas são pré-formadas em um dos polímeros formadores do hidrogel. O segundo é a incorporação de nanopartículas no hidrogel pré-formado, após a gelificação as nanopartículas são adsorvidas em sua matriz. O terceiro trata-se da formação de nanopartículas reativas dentro de um hidrogel pré-formado, onde o precursor metálico é adicionado no processo da obtenção do hidrogel. O penúltimo é a obtenção do hidrogel pela reticulação provida durante a formação das nanopartículas. E por último, a obtenção de hidrogel utilizando nanopartículas, com a presença de agentes de reticulação e/ou outros polímeros (WAHID et al., 2017).

Esse aprisionamento de nanopartículas metálicas na matriz dos hidrogéis podem conferir propriedades físico-químicas e biológicas únicas. Além das aplicações biomédicas, esses compósitos de hidrogéis com nanopartículas metálicas (ouro, prata e outros metais nobres) apresentam propriedades e benefícios mútuos de seus constituintes individuais, levando a obtenção de materiais multifuncionais (REN, 2016). Os compósitos de hidrogéis com nanopartículas de prata tem ampla aplicabilidade em efeito antibacteriano, sendo muito eficazes. Isso ocorre, pois, as propriedades da prata iônica ficam melhor evidenciadas devido a melhor permeação/retenção, as quais habilitam aplicação em feridas e queimaduras, curativos, instrumentos cirúrgicos, e enxertos de pele (NOLAN et al., 2018; PATEL et al., 2014).

Os compósitos de hidrogéis com AuNPs, tal como ocorre com nanopartículas de prata, também podem ser destinados para aplicação antimicrobiana. Além disso, o aprisionamento de AuNPs na matriz do hidrogel tendem a elevar as condutividades elétrica e térmica (NOLAN et al., 2018). Assim eles podem ser utilizados como marcadores cardíacos, para entrega de drogas, biossensores para detecção de biomoléculas, na engenharia de tecidos ósseos e proliferação celular. O efeito de ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR) de nanopartículas de ouro ainda permite aplicações em terapias fototérmicas e termolíticas a laser (GUO et al., 2015).

3.2 NANOPARTÍCULAS DE OURO

As nanopartículas de ouro têm sido amplamente exploradas em pesquisas devido suas propriedades ópticas, químicas e biológicas destacadas, tais como absorção de luz na região do visível, capacidade de se ligar a grande variedade de biomoléculas e baixa toxicidade. Isso tem atraído o interesse de pesquisas nas mais diversas áreas como medicina, na biomedicina e farmacêutica. As propriedades de AuNPs são altamente influenciadas pela morfologia e tamanho, sendo totalmente distintas daquelas observadas para o material na escala *bulk* (SHARMA; PARK; SRINIVASARAO, 2009).

O ouro macroscópico apresenta a coloração amarela/dourada em luz refletida, porém na escala nanométrica é possível observar diferentes colorações quando produzidas suspensões coloidais. Essa, inclusive, é uma das características mais comuns que indicam a formação de AuNPs em suspensão. Essa diferença óptica das AuNPs em relação ao material *bulk* é devido ao LSPR gerado no nanomaterial. O efeito LSPR é um acoplamento ressonante de luz à oscilação de elétrons na superfície metálica, a qual também é conhecida como polárítos de plasmons de superfície (SPP) (AGRANOVICH, 2012; LESUFFLEUR et al., 2008) que são, basicamente, ondas que se propagam longitudinalmente em uma interface metal-dielétrico (MONTEIRO et al., 2013).

Com a incidência direta de luz em nanopartículas metálicas, como as de ouro, pode-se gerar SPPs sem a necessidade do uso de qualquer outro aparato. O efeito observado é denominado LSPR, decorrente da excitação da onda SPP localizadas em dimensões menores que o comprimento de onda da radiação eletromagnética (LE RU; ETCHEGOIN, 2009; MONTEIRO et al., 2013). Na Figura 1 é demonstrado esquematicamente o efeito LSPR em nanopartículas de ouro, onde tem-se o dipolo elétrico gerado pela nuvem eletrônica que oscila na direção oposta do vetor do campo

elétrico da radiação eletromagnética (CORDEIRO et al., 2016; WILLETS; VAN DUYNE, 2007).

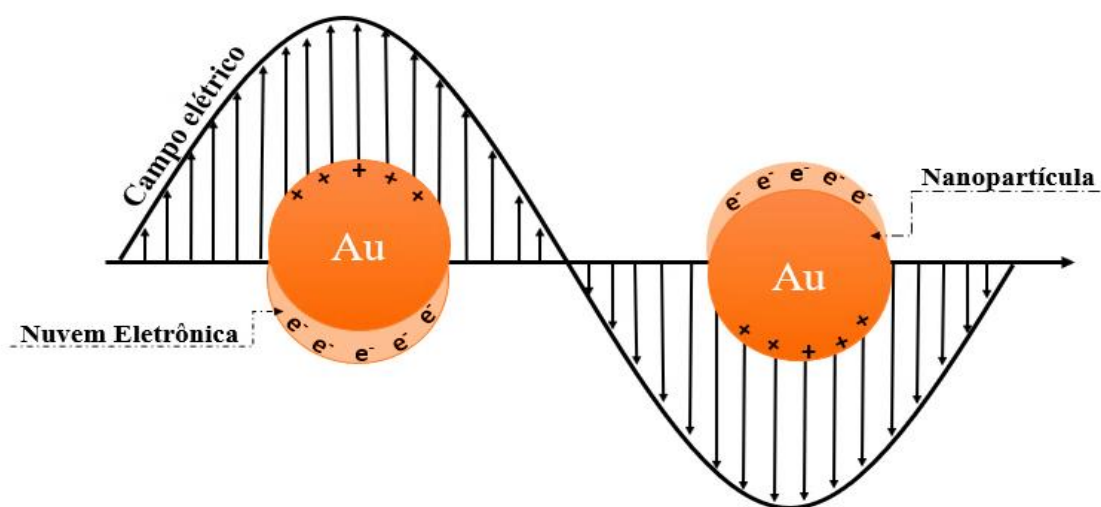


Figura 1. Representação esquemática de LSPR em AuNPs.
Fonte: Autoria própria, 2019.

O efeito macroscópico de LSPR é uma intensa absorção de luz (normalmente da região visível para metais nobres) a qual é observada para uma suspensão coloidal de nanopartículas metálicas (FELDHEIM; FOSS, 2002) efeito LSPR é dependente de fatores tais como índice de refração de entorno das partículas, diâmetro da partícula, distância inter-partícula e morfologia (CAMARA, 2010). Tendo que esse efeito ocorre na região visível, o plasmon de superfície pode ser observado pelo espectro de absorção como mostrado na Figura 2B para nanoesferas de ouro com diferentes diâmetros. Através da Figura 2A é possível observar a variação da coloração das suspensões coloidais de AuNPs a medida que o diâmetro da nanopartícula aumenta. Na Figura 2B, são apresentados os espectros de absorção, onde é possível verificar que à medida que o diâmetro da partícula aumenta, o comprimento de onda máximo desloca para maiores valores além de mostrar um alargamento (NOTARIANNI et al., 2014).

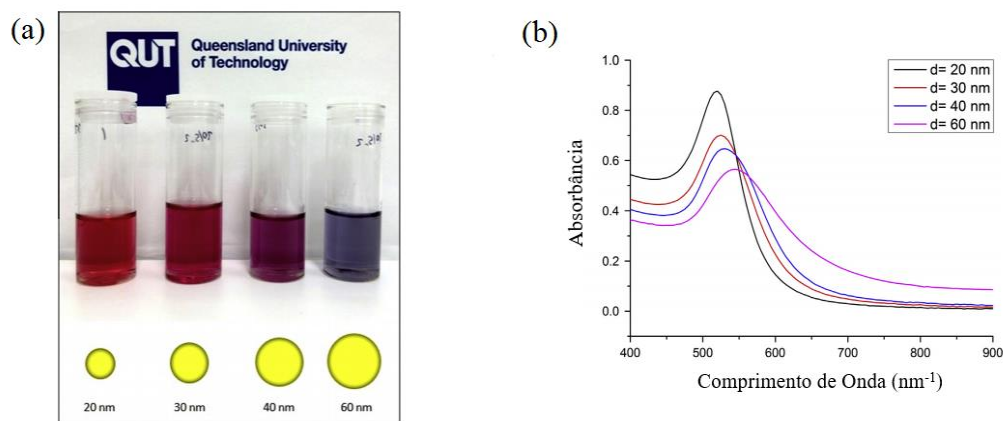


Figura 2. (A) Soluções de nanopartículas de ouro esféricas com diferentes diâmetros e (B) os respectivos espectros de absorção.

Fonte: Notarianni, et al., 2014. Autorizado o uso de imagem.

3.2.1 Síntese de Nanopartículas de Ouro

Existem inúmeras metodologias para a obtenção de AuNPs que podem ser divididas em três tipos sínteses: a química, a física e a biológica (ALAQAD; SALEH, 2016). A Figura 3 demonstra a divisão dos métodos de sínteses e exemplifica algumas dessas rotas para obtenção do nanomaterial.

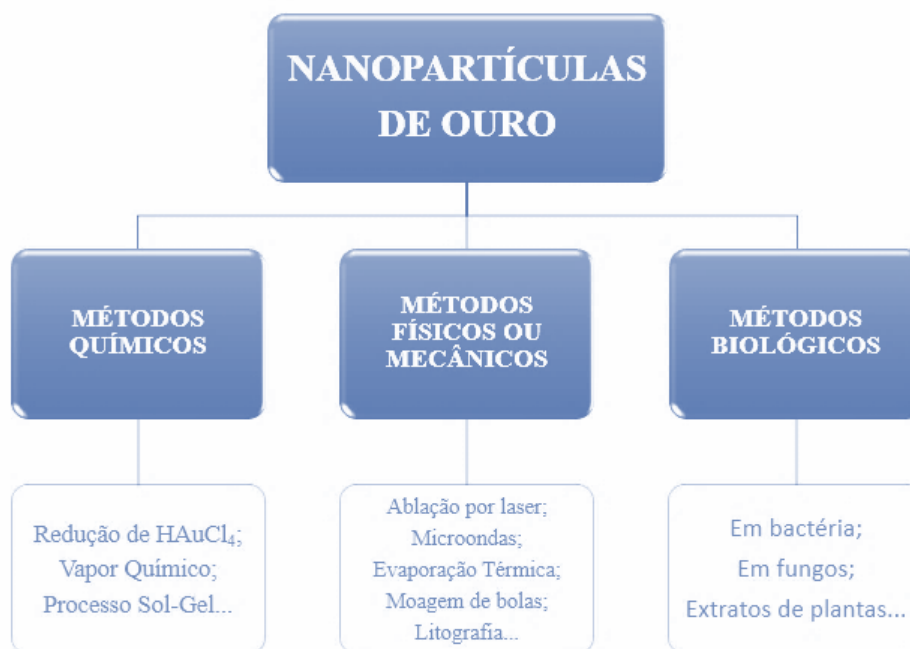


Figura 3. Exemplos de alguns métodos de síntese utilizados para obtenção de AuNPs.

Fonte: Autoria própria, 2019.

O método mais utilizado é a síntese química, que permite a formação de AuNPs menos dispersas e com maior controle do tamanho. Esse tipo de síntese consiste basicamente em duas etapas: a redução do sal de ácido cloroáurico (HAuCl_4) em um solvente (como a água) por meio de um agente redutor; e a estabilização do nanomaterial, a qual impede a formação de aglomerados (HERIZCHI et al., 2016).

Dentre todos métodos químicos para obtenção de AuNPs, o principal método ainda utilizado é o de Turkevitch, desenvolvido em 1951. Esse método utiliza íon citrato como agente redutor do sal de HAuCl_4 . O ânion ainda é capaz de criar uma camada estabilizante que evita a aglomeração das nanopartículas de ouro obtidas, podendo ser por repulsão eletrostática e/ou impedimento estérico (TURKEVICH, JOHN; COOPER, 1951). Porém, ainda pode ser utilizado outros agentes redutores como: o borohidreto de sódio (NaBH_4), o formaldeído, o ácido ascórbico, monóxido de carbono, os tióis e biomoléculas. Como estabilizantes podem ser empregados: citrato trissódico di-hidratado, ligantes de enxofre, dendrímeros, polímeros, entre outros (HERIZCHI et al., 2016).

Alguns métodos tradicionais de obtenção de AuNPs utilizam solventes que podem ocasionar riscos ambientais e biológicos. Além disso, produzem suspensões coloidais com elevada instabilidade frente a mudanças de força iônica, a qual limita suas aplicações *in vivo* (BORKER et al., 2017). Assim, atualmente busca-se alternativas que visam a obtenção de AuNPs estáveis com tamanho controlável, facilitar a conjugação com biomoléculas, alto rendimento de síntese e baixo custo (RIBEIRO et al., 2016). Nessa perspectiva, a utilização de síntese verde ou crescimento *in situ* de AuNPs com fontes renováveis, como polissacarídeos naturais, se torna promissor. Os polissacarídeos, além de propiciar a redução do precursor de ouro e estabilização das AuNPs, exibem propriedades vantajosas como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (VETCHINKINA et al., 2018). Essas características habilitam o emprego de compósitos de polissacarídeos/AuNPs em sistemas biológicos sem riscos de aglomeração e minimizam o efeito da variação da força iônica sobre a estabilidade do material nanoparticulado.

3.3 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são grupos de biopolímeros constituídos por unidades sacarídeas que são unidas por ligações covalente de O-glicosídica, tendo configuração lineares ou ramificadas. Eles são extraídos de organismos naturais como algas, plantas, microrganismos e animais (ZONG; CAO; WANG, 2012).

Por conta de suas propriedades amigáveis à sistemas biológicos, os polissacarídeos têm atraído interesses para aplicações em diversas áreas desde alimentícia até em engenharia de tecidos (NOREEN et al., 2017). Essas macromoléculas também podem ser utilizadas na nanotecnologia para reações de redução de sais precursores usadas na produção de materiais nanoestruturados (LIU et al., 2013). Devido presença de uma vasta variedade de grupos funcionais, a redução do sal precursor ocorre por meio da oxidação dos grupos hidroxilas à grupos carbonilas. Além disso, grupos funcionais (-COOH, -OH e -NH₂) das cadeias dos polissacarídeos podem ser utilizados para complexar e estabilizar as nanopartículas (PARK et al., 2011).

3.3.1 Pectina

A pectina é um polissacarídeo complexo extraída de paredes celulares de plantas e frutas cítricas através de processos térmicos e mecânicos (THAKUR; SINGH; HANDA, 1997). A sua estrutura química pode ser aniônica, sendo constituída de unidades lineares de ácido D-galacturônico e ácido D-galacturônico metoxilado unidas pelas ligações glicosídicas $\alpha(1 \rightarrow 4)$, como demonstrado na Figura 4 (TENTOR et al., 2017).

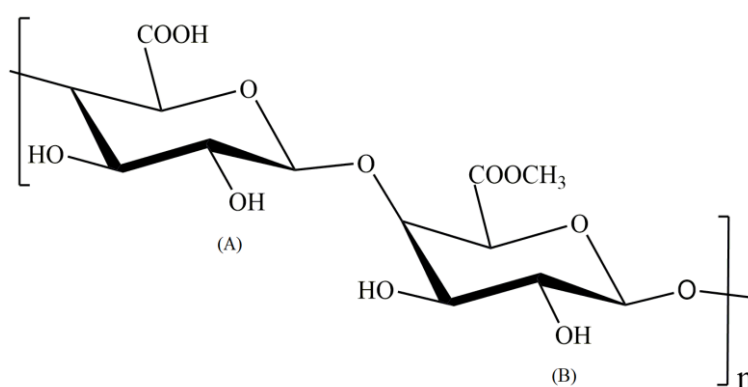


Figura 4. Representação esquemática da estrutura química da pectina, sendo constituída de (A) ácido D-galacturônico e (B) ácido D-galacturônico metoxilado.
Fonte: Autoria própria, 2019.

As cadeias de pectina apresentam grupos funcionais como hidroxilas, ésteres e carboxilatos que podem atuar como ligantes de superfície e podem interagir, sob várias

condições de pH, de maneira mais ou menos eficiente com AuNPs (NIGOGHOSSIAN et al., 2015). A redução de precursores metálicos para produzir nanopartículas já tem sido demonstrada utilizando pectina e pode ser aplicada para produzir materiais com ação anti-inflamatória (REENA et al., 2017).

3.3.2 Quitosana

A quitosana é um termo utilizado para derivados de poli-N-acetil-D-glucosamina, conhecida como quitina, a qual é encontrada em exoesqueletos de crustáceos e em parede celular de fungos e bactérias (LI; DUNN; GRANDMAISON, 1992). Esse polissacarídeo pode ser policatiônico, é obtido através do processo de desacetilação da quitina, onde o N-acetil é substituído total ou parcialmente por grupos aminos ($-NH_2$) (MORRIS et al., 2013). A sua estrutura química é composta por monômeros de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcN) e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcNac) interligadas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, a qual está representada pela Figura 5 (ANTONINO et al., 2017).

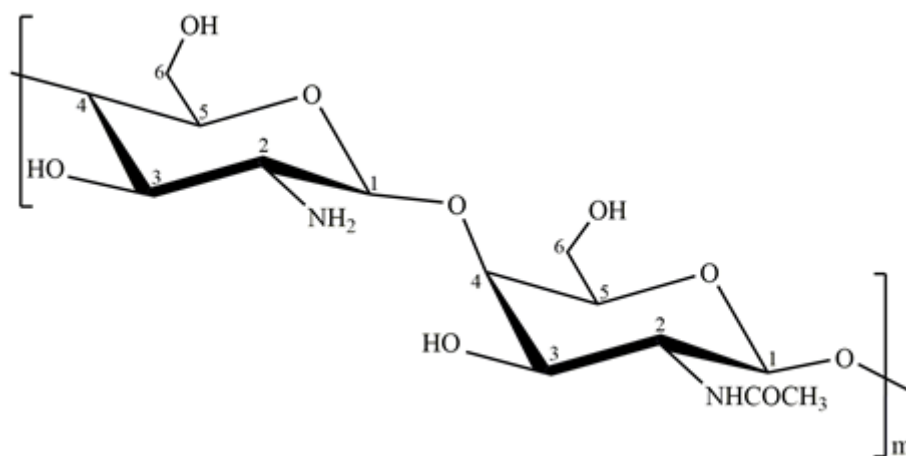


Figura 5. Representação esquemática da estrutura química da quitosana.
Fonte: Autoria própria, 2019.

A solubilidade da quitosana em soluções de ácidos diluídos é possível devido a protonação dos grupos aminos presentes nas suas cadeias (MEDEIROS BORSAGLI et al., 2015). A presença de grupos $-NH_2$ protonados, $-CH_2OH$ e $-NHCOCH_3$, assim como o grau de desacetilação e massa molecular da quitosana são parâmetros importantes para dar a quitosana propriedades redutoras e estabilizadoras interessantes para produção de

AuNPs. Além disso, o controle deles pode habilitar a manipulação do tamanho e morfologia de AuNPs sintetizadas (SUN et al., 2017).

A união de polissacarídeos de cargas opostas, tais como pectina e quitosana, são exploradas para a criação de matrizes tridimensionais hidrofílicas conhecidas como hidrogéis. Matrizes desse tipo podem servir como suporte para AuNPs que habilitam diversas aplicações nas mais diferentes áreas. O estudo realizado por Wu et al. (2015), Wu et al. (2015) demonstra que sistemas de hidrogéis de quitosana contendo AuNPs sintetizadas *in situ* via fotorredução mostraram-se eficazes para remoção catalítica de compostos nitroaromáticos. Além disso, o material mostrou-se estável e reutilizável. Esses compósitos contendo AuNPs *in situ* ainda podem ser aplicados em sistemas de liberação controlada de drogas/medicamentos (CHEN et al., 2012), assim como para a produção de compósitos que mostram atuação antibacteriana e no auxílio de regeneração óssea (RIBEIRO et al., 2017).

3.4 HIDROGEL PECTINA/QUITOSANA

Os hidrogéis são estruturas poliméricas de redes tridimensionais (3D) que são totalmente ou parcialmente hidrofílicas. Essas redes poliméricas são capazes de reter grandes quantidades de água ou fluído biológicos sem que ocorra alterações em sua estrutura. Os hidrogéis podem ser agrupados em duas classes distintas como químicos e hidrogéis físicos, baseando-se no método de formação e manutenção de sua estrutura (YAHIA, 2015).

Hidrogéis químicos ou permanentes apresentam redes poliméricas organizadas que são controladas nos processos de formação através da adição do agente reticulante. Esse propicia a formação de ligações químicas (covalentes) entre cadeias poliméricas ao longo da extensão da macromolécula (AHMED, 2015). Por outro lado, os hidrogéis físicos ou reversíveis são redes poliméricas mantidas pelo grau de entrelaçamento entre as cadeias e sua reticulação acontece através as interações eletrostáticas e interações secundárias (dispersão de London, ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo e íon-dipolo), existente devido a presença dos mais variados grupos orgânicos (carregados ou não) em sua constituição (VARAPRASAD et al., 2017).

A união de pectina e quitosana geram hidrogéis que são classificados como físicos. A sua formação, depende de condições como pH adequado das soluções aquosas

de pectina e quitosana, a qual permite a formação dos chamados complexos polieletrólíticos (PECs). Esses PECs ocorrem através do estabelecimento de interações eletrostáticas entre a amina protonada ($-\text{NH}_3^+$) nas cadeias de quitosana e os grupos de carboxilatos ($-\text{COO}^-$) na pectina (NORDBY et al., 2003; TENTOR et al., 2017).

A incorporação de AuNPs nos hidrogéis podem ocorrer através do intumescimento do hidrogel em uma suspensão nanopartículas pronta, ocasionando o seu aprisionamento na matriz, ou pelo crescimento *in situ* através do processo de redução do sal precursor antes ou durante a confecção da matriz do hidrogel. Em condições apropriadas os hidrogéis são capazes de preservar a integridade da estrutura e funcionalidade das AuNPs (GAO et al., 2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

GENU® pectina com grau de O-metoxilação de 56% e massa molar de 190×10^3 g.mol⁻¹ que foi doada gentilmente pela CP Kelco Co., Limeira-SP (Brasil). A quitosana com um grau de desacetilação de 85% e massa molar de 87×10^3 g.mol⁻¹ que foi adquirida da Golden-Shell Biochemical (China). O sal de ácido tetracloroaurico III trihidratado P.A. (99,9%), com massa molar de 393,83 g.mol⁻¹, adquirida da Synth (Brasil). Outros reagentes tais como: ácido clorídrico (HCl) P.A. (de 36,5% a 38,0%) e hidróxido de sódio (NaOH) P.A. (98%).

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Síntese de hidrogéis de pectina/quitosana

Inicialmente foram testadas as condições de obtenção dos hidrogéis de pectina/quitosana. Diferentes concentrações de solução de pectina foram avaliadas na síntese desde 1,00 a 2,75% (m/v). A concentração da solução de quitosana foi mantida constante a 1,00% (m/v). O emprego de diferentes proporções volumétricas das soluções de pectina e quitosana na síntese também foram estudadas. Todas as condições de síntese testadas estão descritas na Tabela 1. Para obtenção dos hidrogéis, basicamente juntou-se volume adequado (considerando a proporção volumétrica testada) de cada solução aquosa de pectina (pH \approx 4,0) com um volume adequado de solução de quitosana diluída em HCl 0,10 mol.L⁻¹ (pH \approx 1,0), sob agitação mecânica constante durante 10 minutos a 65°C. O volume total da mistura foi fixado em 6 mL.

Tabela 1. Condições estudadas para formação de hidrogéis de pectina e quitosana.

Concentração de sol. pectina % (m/v)	Concentração de sol. quitosana % (m/v)	Proporção Volumétrica (pectina:quitosana)
1,00	1,00	50:50
		60:40
		70:30
		80:20

		50:50
		60:40
2,00	1,00	70:30
		80:20
		50:50
		60:40
2,25	1,00	70:30
		80:20
		50:50
		60:40
2,50	1,00	70:30
		80:20
		50:50
		60:40
2,75	1,00	70:30
		80:20

Fonte: Autoria própria, 2019.

4.2.2 Síntese de AuNPs *in situ* em Pectina

A metodologia para obtenção de AuNPs em pectina foi baseado no trabalho de (NIGOGHOSSIAN et al., 2015). Inicialmente, foram preparadas 50 mL de soluções de pectina, nas proporções de 2,25%, 2,50% e 2,75% (m/v), em água deionizada a 65°C, sob agitação mecânica. Após a solubilização completa da pectina, foram adicionados, em cada solução do polissacarídeo, 19, 39 e 59 µL de solução de HAuCl₄ (o precursor de ouro) na concentração de 0,254 mol.L⁻¹, para concentrações finais de 1x10⁻⁴, 2x10⁻⁴ e 3x10⁻⁴ mol.L⁻¹, respectivamente. Isso resulta em um total de 9 diferentes condições de síntese. As misturas foram mantidas sob agitação e temperatura de 65°C até observar a mudança e manutenção da coloração da solução, perfazendo um tempo de 1 h. Para acompanhar a formação de AuNPs em pectina, espectros de absorvância foram obtidos das suspensões produzidas por meio de um espectrômetro portátil (da marca Ocean Optics, modelo USB4000), na faixa de 200 a 800 nm, provido por cubetas de poliestireno transparente e visualizado no software de operação SpectraSuite, versão 2.0.162.

4.2.3 Produção de Compósitos de Pectina-AuNPs/Quitosana

As condições de síntese (Tabela 1) em que houveram formação de hidrogéis foram utilizadas para produção de compósitos. O procedimento de produção dos compósitos de pectina-AuNPs/quitosana foi adaptado dos trabalhos de Nordby et al., 2003 e Tentor et al., 2017. Simplificadamente, 3,6 mL de cada solução de pectina-AuNPs (pH \approx 3,8) (descrita na seção anterior) foram adicionados lentamente em 2,4 mL de solução de quitosana 1,0% (m/v) diluída em 0,10 mol.L⁻¹ de HCl (pH \approx 1,0), sob agitação mecânica durante 10 minutos a 65°. Após a obtenção das misturas, eles foram deixados esfriar naturalmente até atingir o ponto de gel e então atingir temperatura ambiente. Após isso, os materiais foram imersos em água deionizada, com trocas de 12 em 12 horas, e o pH foi ajustado para próximo de 5,8 com NaOH a 0,1 mol.L⁻¹. Após a lavagem, os mesmos foram congelados e liofilizados por 72 horas a -50°C para obtenção dos compósitos secos para caracterização e ensaio de desintegração. A Tabela 2 apresenta todas as condições de síntese para os compósitos e como cada amostra foi identificada. O pH das diferentes soluções de pectina empregadas nas sínteses dos compósitos permaneceu constante.

Tabela 2. Condições experimentais usadas para a produção compósitos de pectina-AuNPs/quitosana.

Amostra	H ₂ AuCl ₄ (10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹)	Concentração da sol. pectina % (m/v)	Concentração da sol. quitosana % (m/v)
A0	-		
A1	1,00	2,25	1,00
A2	2,00		
A3	3,00		
B0	-		
B1	1,00	2,50	1,00
B2	2,00		
B3	3,00		
C0	-		
C1	1,00	2,75	1,00
C2	2,00		
C3	3,00		

Fonte: Autorial própria,2019.

4.3 CARACTERIZAÇÃO

4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos compósitos foram investigados através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JSM 6500F, escaneamento de emissão de campo microscópico eletrônico JEOL, Japão), onde as amostras foram revestidas por pulverização com um liga de paládio-ouro a uma espessura de 10 nm (10-15 mA, sob vácuo de 130 mTorr). O equipamento foi operado a uma voltagem de aceleração de 5 kV e de três a seis locais foram visualizados em cada amostra, realizado na *Colorado State University* – USA.

4.3.2 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (X-ray Photoelectron Spectroscopy - XPS)

A química das superfícies dos compósitos com AuNPs foi avaliada utilizando um espectrofotômetro Phi Electronics 5800 Spectrometer (da marca Chanhasen, MN). A XPS foi realizada com uma fonte de raios-x monocromática Al K α ($h\nu = 1468,6$ eV), um analisador hemisférico e um detector multicanal. Os espectros de alta resolução foram obtidos utilizando uma energia de passagem do analisador de 23,5 eV, com passos de 0,10 eV e um ponto de raio-x de 800 μ m. Os espectros foram obtidos com um ângulo de retirada de fotoelétrons de 45°. Uma pistola eletrônica de baixa energia foi usada para neutralização de carga. O ajuste da curva espectral foi feito usando Origin 8.5. Ajuste de curva de todos os espectros usou um fundo de Shirley. Os picos gaussianos foram ajustados de acordo com os grupos funcionais esperados. A altura de cada pico foi ajustada em primeiro lugar, mantendo a posição de cada pico, largura total na metade do máximo (FWHM) e porcentagem de Gauss fixos. Em seguida, o FWHM, por cento Gaussian e, finalmente, a posição estava em forma, minimizando o valor de qui-quadrado (MARTINS et al., 2018a). A análise foi realizada na *Colorado State University* – USA.

4.3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros de FTIR foram registrados usando um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Shimadzu Scientific Instruments, modelo

Cary 630), operando de 650 a 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} , obtida após a acumulação de 64 varreduras. As amostras secas e em pó foram misturadas com KBr (~1,0% em massa), e prensadas antes de realizar a medição dos espectros. A análise foi realizada na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Apucarana.

4.3.4 Grau de Intumescimento (GI)

A capacidade de absorção de fluidos pelos compósitos foi observada por medidas de grau de intumescimento (GI). Para isso, os compósitos liofilizados foram pesados inicialmente (M_s), imersos em PBS ($\text{pH} = 7,4$) e incubados em um Shaker (modelo Thoth 6430), a 37°C com agitação (100 rpm). Após 24 horas, as amostras foram removidas das soluções e o excesso de solução foi removido. Na sequência elas foram filtradas em papel filtro e então pesadas novamente (M_i). O GI foi determinado através da Equação 1.

$$GI = \frac{(M_i - M_s)}{M_s} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Os experimentos foram realizados com $n = 2$. Os resultados foram comparados estatisticamente aos testes ANOVA e Tukey, com nível de significância de 1 e 5%, utilizando o programa GraphPad Prisma 6.0.

4.3.5 Ensaio de Desintegração/Degradação

A massa seca inicial ($M_{\text{seca-I}}$) dos hidrogéis foi aferida logo após a liofilização. Em seguida, o hidrogel seco (~0,1 g) foi imerso em 50 mL de PBS ($\text{pH} \approx 7,4$) e incubado em um Shaker (modelo Thoth 6430), a 37°C com agitação (100 rpm). Os hidrogéis foram removidos da solução tampão PBS, nos intervalos de tempo desejados (1, 3, 5, 7 e 14 dias), sendo novamente liofilizados (como descrito anteriormente) e pesados para avaliar a massa seca final ($M_{\text{seca-F}}$). O percentual de massa seca restante (%) foi determinado usando a Equação 2.

$$\text{Massa restante (\%)} = \frac{M_{seca-I} - M_{seca-F}}{M_{seca-I}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Os experimentos foram realizados com $n = 2$. Os resultados foram comparados estatisticamente aos testes ANOVA e Tukey, com nível de significância de 5%, utilizando o programa GraphPad Prisma 6.0.

4.3.6 Ponto de Carga Zero (pHpzc)

O procedimento de pHpzc foi determinado através da adição de 10 mg do composto seco e triturado em um recipiente contendo 10 mL de solução aquosa de NaCl $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, cujo pH foi previamente ajustado com soluções de HCl ou NaOH (ambos $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$). No total, foram utilizados sete recipientes contendo solução salina com pH distintos (entre 2 e 8). Esses recipientes foram levados ao Shaker (modelo Thoth 6430), sob agitação de 100 rpm e a 25°C , durante 24 h. Ao final desse tempo, a solução foi filtrada e o pH das soluções foram medidos. O procedimento foi realizado em duplicata.

4.3.7 Difração de Raio-X (DRX)

Os perfis de difração de raio-x, foram gravados por um difratômetro Shimadzu, modelo XRD-600, Japão, equipado com uma radiação Cu-K α e Ni-filtrada. Os perfis de DRX foram coletados em uma faixa de espalhamento (2θ) de 5° a 60° , com resolução de $0,02^\circ$, a uma velocidade de varredura de 2°min^{-1} . As análises foram realizadas aplicando uma voltagem de aceleração de 40 kV a 30 mA. A caracterização foi realizada na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

4.4 ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR

4.4.1 Cultura de células

Nesse estudo, foram utilizadas células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (células ADSC). As células ADSC foram cultivadas a 37°, em uma atmosfera a 5% de CO₂, em frascos de cultura de tecido de poliestireno, com dimensão de 175 cm². O meio de crescimento celular foi realizado através do Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) com 10% de soro fetal de bovino e 1% de penicilina/estreptomicina. Três células de passagem foram utilizadas. Antes de semear as células, amostras de hidrogel seco (diâmetro de 8,0 mm), foram obtidas usando foram obtidas usando uma alça de sementeira. Então, essas membranas foram fixadas em suportes de teflon (diâmetro de 8,0mm) com fitas de carbono e incubadas em PBS por 30 minutos sob exposição a luz UV. Após as células foram semeadas nas amostras a uma concentração de 5000 células/poço em placas de 48 poços e foram cultivadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ (MARTINS et al., 2018b). Sendo realizada na *Colorado State University* – USA.

4.4.2 Ensaio de citocompatibilidade *via* método AlamarBlue

A viabilidade celular para as ADSCs foi determinada pelo ensaio CellTiter-Blue® (Promega G808A, Madison, WI), de acordo com instruções do fabricante. Após 4 dias, 50 µL do corante CellTiter-Blue (AlamarBlue) foram adicionados aos poços contendo as amostras semeadas com as células em meio de cultura DMEM. Em seguida, cada conjunto foi incubado por 4h a 37°C e 5% de CO₂. Assim, a absorbância do sobrenadante dos poços foi lida em leitor de microplacas (Molecular Devices Spectra Max M3, Sunnyvale, CA, USA) em 570 nm e 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. O experimento continha o meio DMEM (com a presença de células, controle negativo), as amostras (compósitos de pectina-AuNPs/quitosana com células) e AlamarBlue (sem presença de célula e amostra, apenas com meio de cultura). Além disso, foi empregado um controle positivo consistindo de folhas de titânio (amostra com 8 mm de diâmetro). O uso do AlamarBlue nos testes objetivou eliminar a contribuição do meio de cultura na redução dos valores de AB% e, então, normalizar os resultados de viabilidade celular (%) para

apenas computar o efeito celular. Os experimentos foram realizados com $n = 5$. Os resultados foram comparados estatisticamente aos testes ANOVA e Tukey, com nível de significância de 5% (GraphPad Prism 6.0) (MARTINS et al., 2018b). Esses experimentos foram realizados na *Colorado State University* – USA.

4.5 TERMOSENSIBILIDADE

As temperaturas sol-gel e os tempos necessário para atingir o ponto de geleificação dos compósitos foram determinados pelo método de inclinação (*tilting method*). Esse método consiste da inclinação de frascos contendo solução pectina-AuNPs/quitosana em temperaturas definidas e previamente ajustadas com intuito de determinar a temperatura à qual a solução não flui (temperatura de gelificação). Frascos acrílicos selados, de 10 mL, contendo a mistura pectina-AuNPs/quitosana (6,0 mL, preparados conforme descrito no item 3.2.3) foram colocados em um reator de vidro acoplado a um banho termostatizado inicialmente a 65°C. A temperatura do reator foi medida por um termômetro digital (modelo ITTH-1400). O teste de inclinação foi realizado e então a temperatura do banho foi ajustada para 62°C e, em seguida, reduzida gradativamente a uma taxa de 2°C a cada 30 minutos, até a gelificação da solução ser observada. Também foi avaliado o tempo necessário para atingir o ponto de gel. Para isso frascos contendo misturas de pectina-AuNPs/quitosana (6,0 mL a 65°C) foram imersos em um banho de água a 25°C. O tempo no qual a solução pectina-AuNPs/quitosana não flui mais foi tomado como o tempo de gelificação. Estes processos foram repetidos duas vezes ($n = 2$) (TENTOR et al., 2017).

4.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DA SUSPENSÃO COLOIDAL DE AUNPS

4.6.1 Síntese de AuNPs pelo Método de Turkevich

Para obtenção de AuNPs foi utilizado o método de Turkevich (TURKEVICH, JOHN; COOPER, 1951). O arranjo experimental montado consistiu de um sistema de

refluxo composto por um condensador Grahan (serpentina) acoplado a um balão de fundo redondo com três bocas com uma manta de aquecimento, um agitador magnético e o termômetro acoplado ao sistema.

Ao balão foi adicionado 100 mL de solução de HAuCl_4 $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e aquecida até atingir 100°C , sob refluxo e agitação constante. Ao atingir a temperatura desejada, foram adicionados à mistura aquecida 5 mL de solução de citrato de sódio 1% (m/v) e mantido em refluxo por 35 minutos.

Após a conclusão da síntese, a solução foi resfriada rapidamente em banho de gelo até atingir uma temperatura de aproximadamente 15°C .

4.6.2 Estudo de estabilidade das suspensões coloidais de Nanopartículas de Ouro

Para avaliar a estabilidade das AuNPs nos diferentes meios foram utilizadas suspensões coloidais de pectina (descrita no item 4.2.2), do compósito produzido (item 4.2.3) e aquelas obtidas pelo método de Turkevich (item 4.6.1). Os efeitos da temperatura e tempo de armazenamento, foram utilizados para avaliação de estabilidade das suspensões coloidais de AuNPs, as quais foram armazenadas a 4°C e à temperatura ambiente (25°C) por 90 dias (3 meses) e analisadas por espectroscopia no visível. Todas as suspensões de AuNPs avaliadas foram embaladas com papel alumínio e armazenado no escuro durante todo o período de medição. As suspensões de AuNPs armazenadas a 4°C foram equilibradas a temperatura ambiente antes das medições.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 SÍNTESE DE AuNPs *in situ* EM PECTINA

Para acompanhar a síntese de AuNPs em pectina foi utilizada a varredura por espectrofotometria no visível de 400 a 800 nm. A obtenção de AuNPs já foi inicialmente indicada pelo surgimento da coloração que variou de rosa a roxa para as suspensões obtidas (inserções nas Figuras 6, 7 e 8) em todas condições testadas. Os espectros visível para todas as condições de síntese estão mostrados nas Figuras 6, 7 e 8. Eles confirmaram a formação AuNPs em pectina, pelo aparecimento de bandas características de LSPR para AuNPs observadas entre 538 a 552 nm para as diferentes suspensões (DEVENDIRAN et al., 2016).

Observando ainda os espectros das Figuras 6, 7 e 8 verificou-se que a intensidade de absorção das bandas LSPR para as suspensões de AuNPs teve um aumento significativo conforme a concentração do sal precursor aumentou, considerando uma mesma concentração de solução de pectina. Isso indica que uma maior população de AuNPs foram produzidas, o que é natural já que maior quantidade de precursor de ouro foi empregada. O mesmo comportamento não foi observado quando a concentração do polissacarídeo aumentou, de forma que a absorbância máxima obtida ficou ao redor de 0,8 (na concentração máxima do precursor) para as três diferentes condições de polissacarídeo. Isso indica que, mesmo na concentração mais baixa de pectina, há grupos suficientes para reduzir todo precursor, mesmo na maior concentração de HAuCl_4 testada. Devendira et al. (2016) propõe que há um ponto de saturação entre a pectina e sal HAuCl_4 , a qual implica que maiores concentrações de pectina devem inibir o processo de redução e, conseqüentemente a formação de AuNPs devido a saturação de grupos que atuam estabilizando o ouro iônico. Contudo, aqui, mesmo na maior concentração da pectina, a intensidade máxima obtida alcançou absorbância máxima por volta de 0,8 (Figura 8). Isso indica que o ponto de saturação não foi atingido.

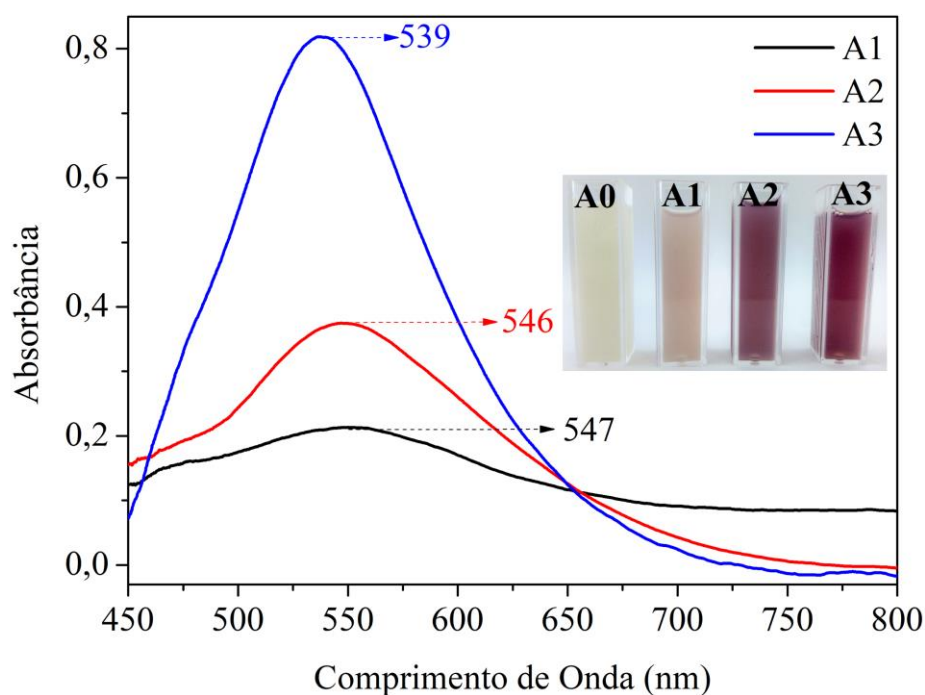


Figura 6. Espectros no visível de AuNPs em pectina 2,25% (m/v). Sendo: A1 com 1×10^{-4} mol.L⁻¹, A2 com 2×10^{-4} mol.L⁻¹ e A3 com 3×10^{-4} mol.L⁻¹ de HAuCl₄. Inserção: imagens fotográficas das suspensões coloidais obtidas para as diferentes condições de síntese testadas.

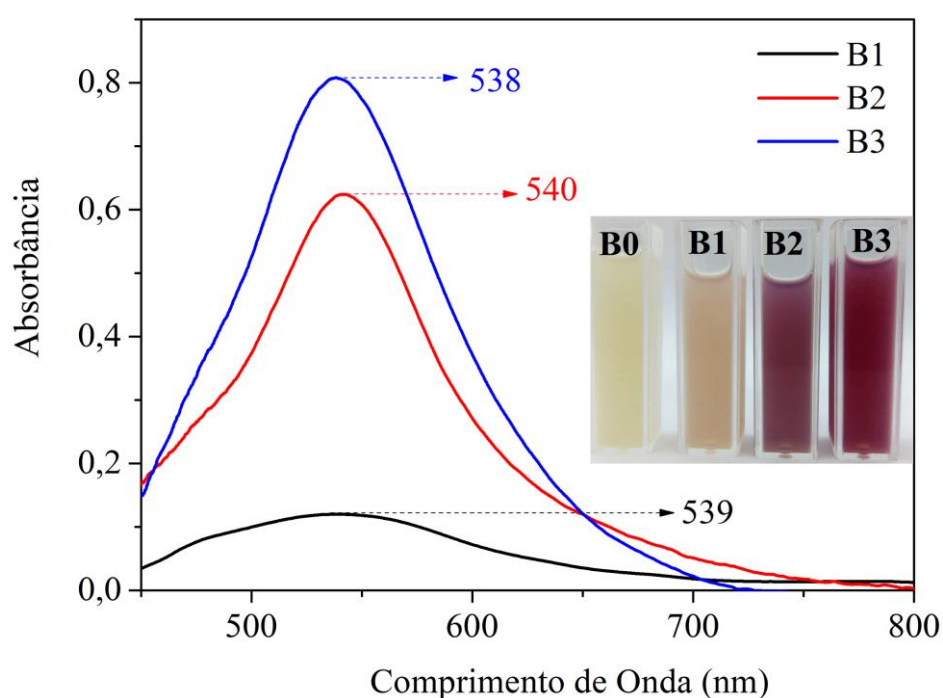


Figura 7. Espectros no visível de AuNPs em pectina 2,50% (m/v). Sendo: B1 com 1×10^{-4} mol.L⁻¹, B2 com 2×10^{-4} mol.L⁻¹ e B3 com 3×10^{-4} mol.L⁻¹ de HAuCl₄. Inserção: imagens fotográficas das suspensões coloidais obtidas para as diferentes condições de síntese testadas.

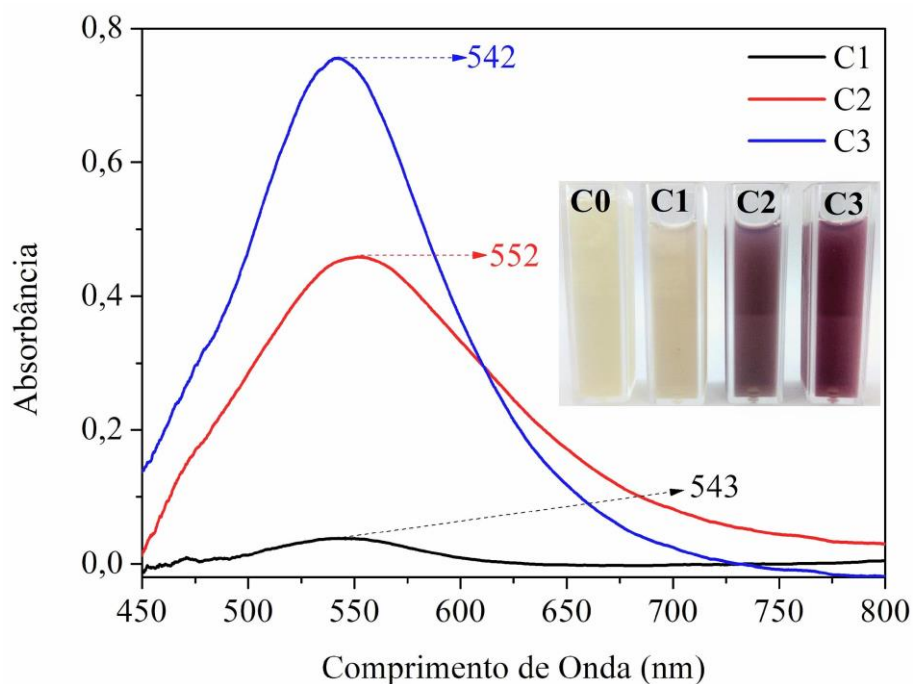


Figura 8. Espectros no visível de AuNPs em pectina 2,75% (m/v). Sendo: C1 com 1×10^{-4} mol.L $^{-1}$, C2 com 2×10^{-4} mol.L $^{-1}$ e C3 com 3×10^{-4} mol.L $^{-1}$ de HAuCl $_4$. Inserção: imagens fotográficas das suspensões coloidais obtidas para as diferentes condições de síntese testadas.

Os espectros mostram ainda que o diâmetro médio das nanopartículas obtidas tendem a serem menores quando a concentração da solução de HAuCl $_4$ torna-se maior. Isso pode ser sugerido pois os máximos de extinção exibem um deslocamento para o azul (região mais energética) conforme a concentração do precursor de ouro cresce (olhar máximos nos espectros A1, A2 e A3 na Figura 6, como exemplo). Por outro lado, a mudança na concentração da solução de pectina não influencia de maneira lógica na distribuição média de tamanhos das AuNPs.

5.2 OBTENÇÃO DOS HIDROGÉIS DE PECTINA/QUITOSANA E DOS COMPÓSITOS PECTINA-AuNPs/QUITOSANA

Dentre todas as condições testadas para a produção de hidrogéis de pectina/quitosana (Tabela 1) apenas 3 delas resultaram na obtenção de hidrogéis estáveis, as quais estão indicadas na Tabela 3. Foi possível verificar que apenas quando a solução de pectina empregada atingiu uma concentração de 2,25% (m/v) foi possível produzir um material estável. Para todas as condições testadas, apenas para a proporção volumétrica 60:40 (pectina:quitosana), ou nas condições em que a razão de massa ficou entre 3,38 e 4,12, foram observadas a gelificação. Exceção da razão 4,00 obtida na menor

concentração de pectina. Isso deve ocorrer pois em concentrações baixas de pectina, a densidade de cadeias poliméricas e o entrelaçamento entre elas não ocorre em extensão suficiente para favorecer a formação de uma matriz estável, mesmo se a razão ótima é obedecida. Com relação a relação mássica ótima, o elevado grau de O-metoxilação da pectina fez com que fosse necessário ser aplicada uma massa relativamente maior (3,4 a 4,1 vezes) desse polissacarídeo na síntese para que a gelificação fosse observada. Isso foi necessário possivelmente para que houvesse maiores densidades tanto de pontos de reticulação por meio dos grupos carregados e hidrofílicos como de cadeias poliméricas para estabilizar a matriz na forma de hidrogel. Contudo um excesso de pectina deve causar um grande desbalanço de cargas e não permitir a gelificação.

Tabela 3. Condições de síntese, razão mássica dos polissacarídeos e avaliação da ocorrência ou não da formação de hidrogéis de pectina/quitosana.

Concentração de sol. pectina % (m/v)	Concentração de sol. quitosana % (m/v)	Proporção Volumétrica (pectina:quitosana)	Razão pectina/quitosana (m/m)	Formou hidrogel?
1,00	1,00	50:50	1,00	Não
		60:40	1,50	Não
		70:30	2,33	Não
		80:20	4,00	Não
2,00	1,00	50:50	2,00	Não
		60:40	3,00	Não
		70:30	4,67	Não
		80:20	8,00	Não
2,25	1,00	50:50	2,25	Não
		60:40	3,38	Sim
		70:30	5,25	Não
		80:20	9,00	Não
2,50	1,00	50:50	2,50	Não
		60:40	3,75	Sim
		70:30	5,83	Não
		80:20	10,00	Não
2,75	1,00			

50:50	2,75	Não
60:40	4,12	Sim
70:30	6,42	Não
80:20	11,00	Não

Com base nos resultados obtidos nos testes realizados (Tabela 3) foram escolhidas para a produção dos compósitos as três condições em que hidrogéis de pectina/quitosana foram obtidos. As soluções de pectina empregadas na obtenção dos compósitos contemplando as concentrações de 2,25, 2,50 e 2,75% (m/v) estiveram agora associadas com AuNPs. A Figura 9 mostra as imagens digitais dos hidrogéis de pectina/quitosana (amostras A0, B0 e C0) e dos compósitos de pectina-AuNPs/quitosana obtidos nas diferentes condições testadas (Tabela 2). Segundo Rodrigues et al. (2015), em concentrações relativamente elevadas de HAuCl_4 pode não haver a formação de hidrogéis na presença de nanopartículas produzidas *in situ*. Isso ocorre devido ao excesso de sal oxidante e/ou presença de AuNPs, as quais devem estabilizar as cargas e grupos hidrofílicos das cadeias poliméricas que são responsáveis pela reticulação. Isso pode retardar ou até anular a gelificação (RODRIGUES et al., 2015). Os resultados aqui apresentados mostraram que as concentrações do precursor de ouro usadas não foram suficientes para impedir a reticulação física. A presença de AuNPs não inibiu a formação dos hidrogéis em nenhuma condição avaliada. Além disso, mesmo com concentrações modestas de AuNPs na matriz dos hidrogéis, a coloração característica de AuNPs foi visível, a qual indica claramente a presença do nanomaterial incluso na matriz.

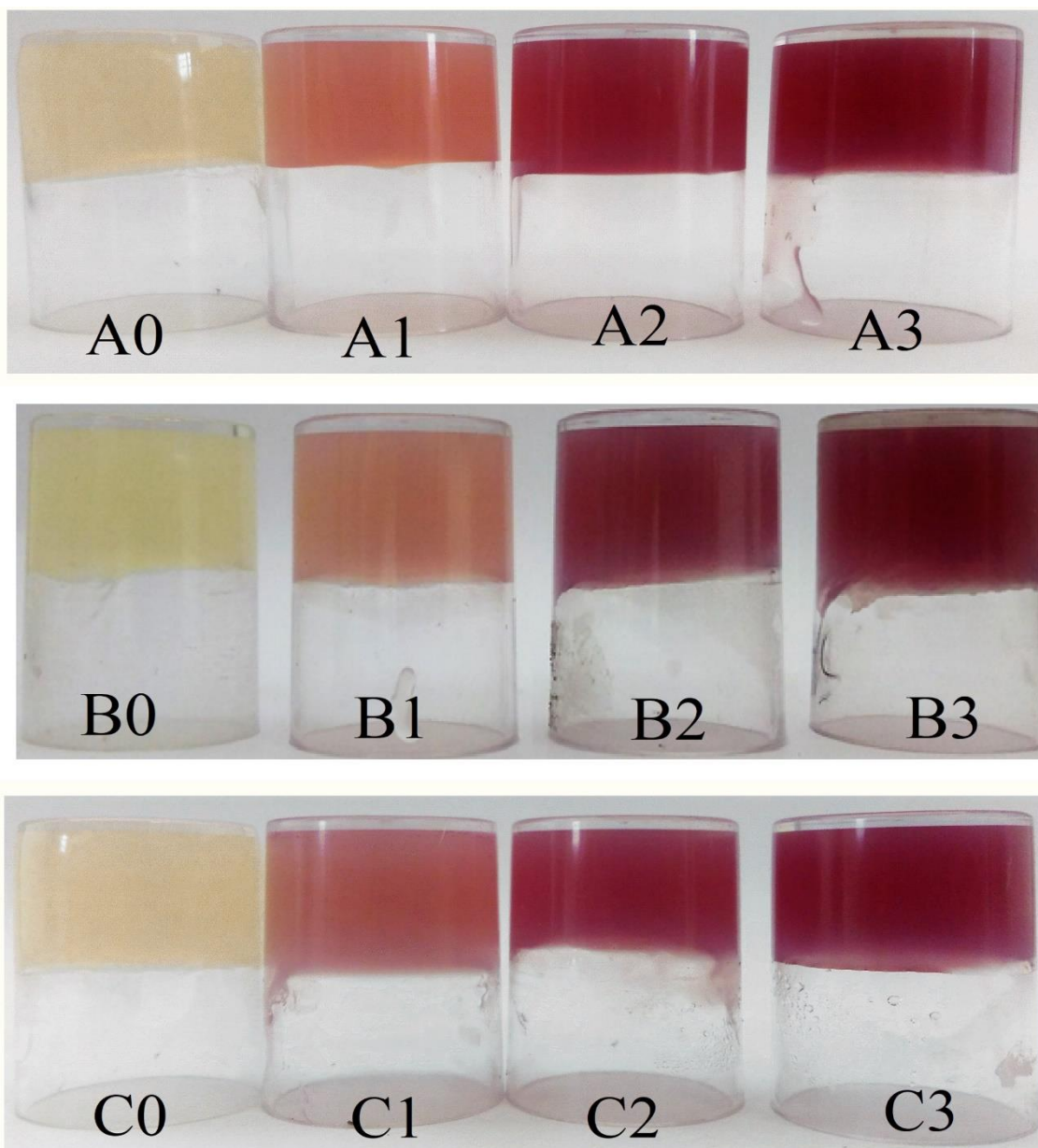


Figura 9. Imagens digitais dos compósitos de Pectina-AuNPs/Quitosana obtidos a partir de soluções nas concentrações propostas pela Tabela 1, onde: A é referente a 2,25% (m/v), B) 2,5% (m/v) e, C) 2,75% (m/v) de pectina, sendo todos obtidos com solução de quitosana 1% (m/v).

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada para avaliar a morfologia da superfície dos compósitos de pectina-AuNPs/quitosana. A morfologia da superfície dos hidrogéis secos (Figura 10) apresentam baixa rugosidade, estrutura compacta, homogênea e sem poros.

O tipo de morfologia visualizada para as superfícies dos compósitos pode ser justificada pelas fortes interações entre as cadeias de pectina e quitosana que propiciaram

a formação de superfícies compactas como aquelas observadas em membranas de pectina/quitosana reportadas na literatura (MARTINS et al., 2018a). Isso ratifica que a presença de AuNPs na matriz do hidrogel não foi suficiente para diminuir a interação entre as cadeias poliméricas, o que possivelmente produziria poros ou rugosidade na superfície do compósito.

Foi possível observar que as AuNPs de ouro permaneceram internalizadas na matriz do hidrogel, tendo em vista que elas foram muito raramente observadas pelas imagens de MEV. A Figura 11 mostra a presença de possíveis e raras nanopartículas de ouro com formato esférico para as amostras A1 e A2.

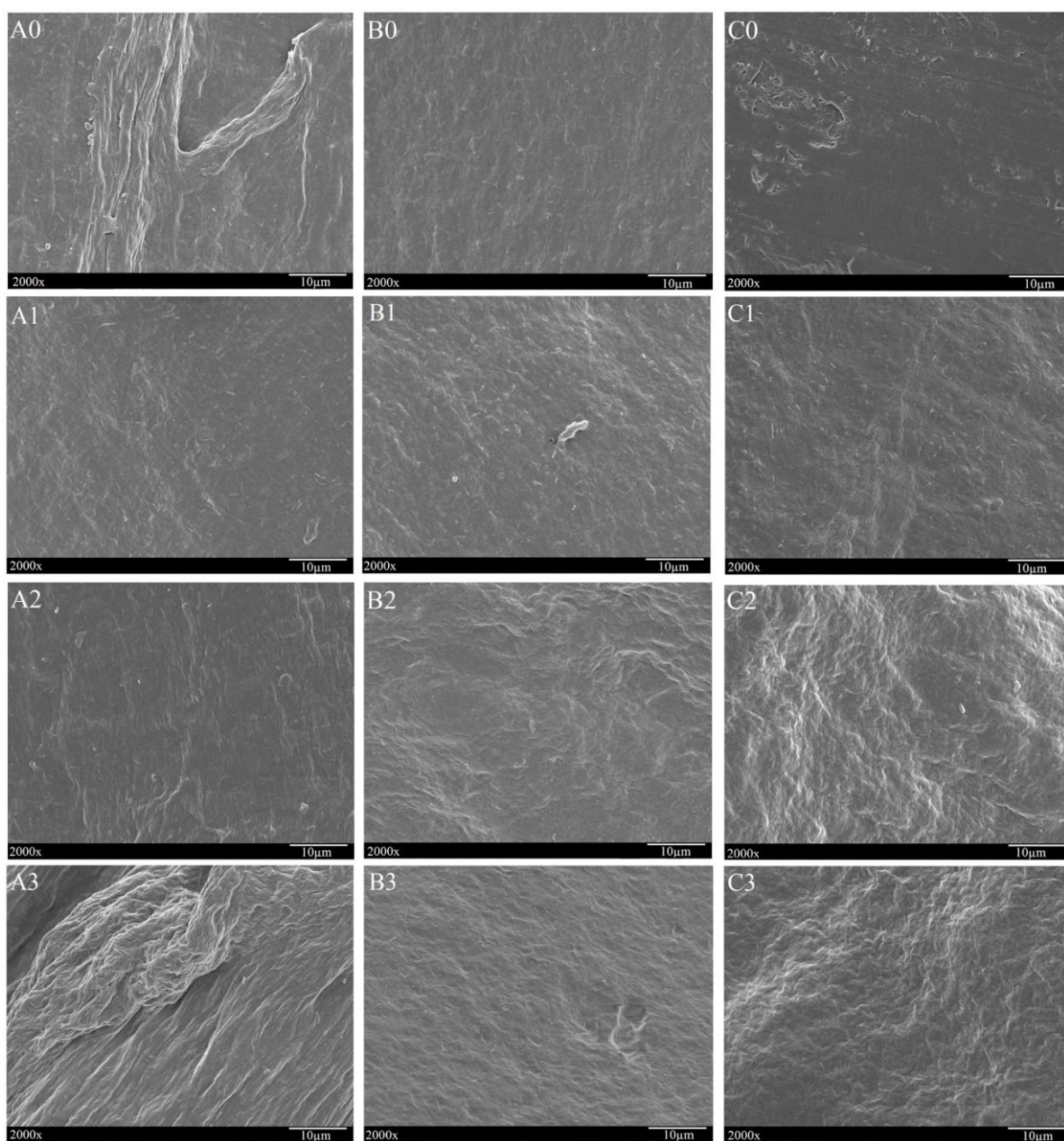


Figura 10. Micrografias de MEV da superfície dos compósitos a base de Pectina-AuNPs/Quitosana (em magnificação de 2.000x). Em (A) compósitos contendo 2,25% (m/v) e 1% (m/v) de quitosana, (B) compósitos contendo 2,5% (m/v) e 1% (m/v) de quitosana e (C) compósitos contendo 2,75% (m/v) e 1% (m/v) de quitosana. A numeração crescente indica: (0) não há adição de H_{AuCl}₄, (1) possui 1×10^{-4} mol.L⁻¹, (2) possui 2×10^{-4} mol.L⁻¹ e (3) possui 3×10^{-4} mol.L⁻¹ de H_{AuCl}₄.

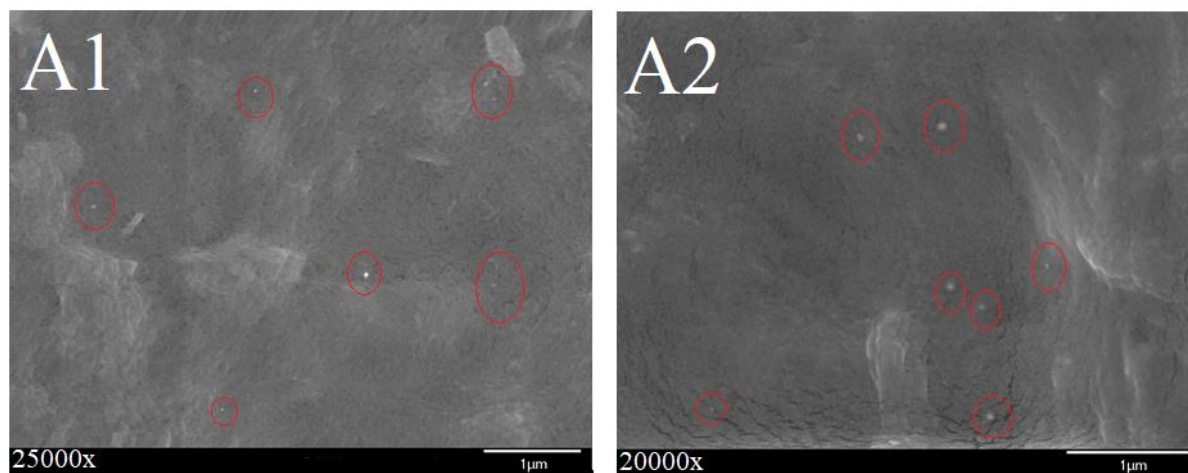


Figura 11. Micrografias de MEV da superfície dos compósitos com a presença de AuNPs em A2 (magnificação 25.000x) e A1 (magnificação 20.000x). Sendo que: A2 possui 2×10^{-4} mol.L⁻¹ e A1 possui 1×10^{-4} mol.L⁻¹ de H_{AuCl}₄.

5.4 ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS-X (X-RAY PHOTOELECTRON SPECTROSCOPY - XPS)

Para avaliar a composição elementar da superfície dos compósitos foi utilizada a técnica de XPS. Os espectros de XPS para todos os compósitos produzidos estão apresentados na Figura 12. Todos os espectros das amostras apresentaram picos de O1s (~533 eV), de N1s (~402 eV) e C1s (~288 eV), as quais são referentes a composição elementar dos polissacarídeos utilizados. Os picos de N1s nos espectros são especificamente relacionados com a presença de quitosana na estrutura dos compósitos.

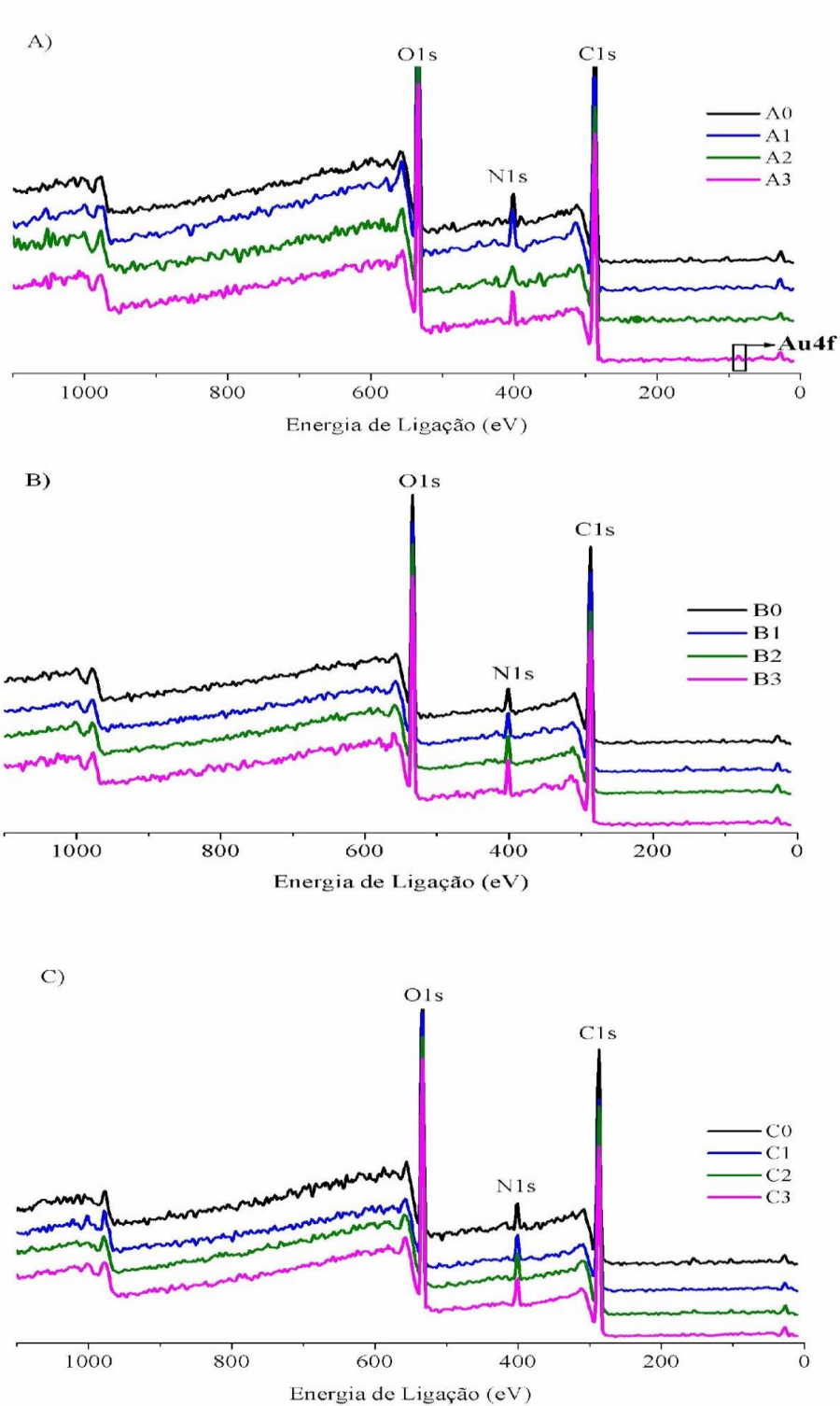


Figura 12. Espectros de varredura XPS dos compósitos contendo (A) 2,25%, (B) 2,5% e (c) 2,75% (m/v) de pectina. Todas amostras preparadas em solução 1% (m/v) de quitosana. A numeração situada na frente indica: (0) não há adição, (1) possui 1×10^{-4} mol.L⁻¹, (2) possui 2×10^{-4} mol.L⁻¹ e (3) possui 3×10^{-4} mol.L⁻¹ de HAuCl₄.

Os picos com intensidade apreciável para as AuNPs (Au4f) não foram detectados o que indica, mais uma vez, que o nanomaterial encontra-se encapsulado pela matriz dos polissacarídeos e não expostos. Esse resultado corrobora com aquele conseguido durante

a análise das imagens de MEV, onde foi verificada uma presença bastante rara de AuNPs na superfície do compósito. Uma análise mais minuciosa dos espectros da Figura 12 mostra que é possível indicar sinal relativo ao nível 4f do ouro, a qual ocorreu apenas para amostra A3. Isso justifica o fato da obtenção de sinal fraco (ao redor de 88 eV, Figura 12A) e aleatório visualizado para a amostra A3. O sinal fica mais evidente quando o espectro de XPS de alta resolução nessa região é avaliado. Na realidade, para o nível Au4f, duas bandas em 84,5 eV e 87,2 eV foram visualizadas no espectro de XPS de alta resolução apresentado na Figura 13. Esses sinais correspondem aos microestados Au4f_{7/2} e Au4f_{5/2}. Isso comprova a presença de raras AuNPs reduzidas pela pectina 2,25% (m/v) localizadas na superfície do hidrogel (REENA et al., 2017).

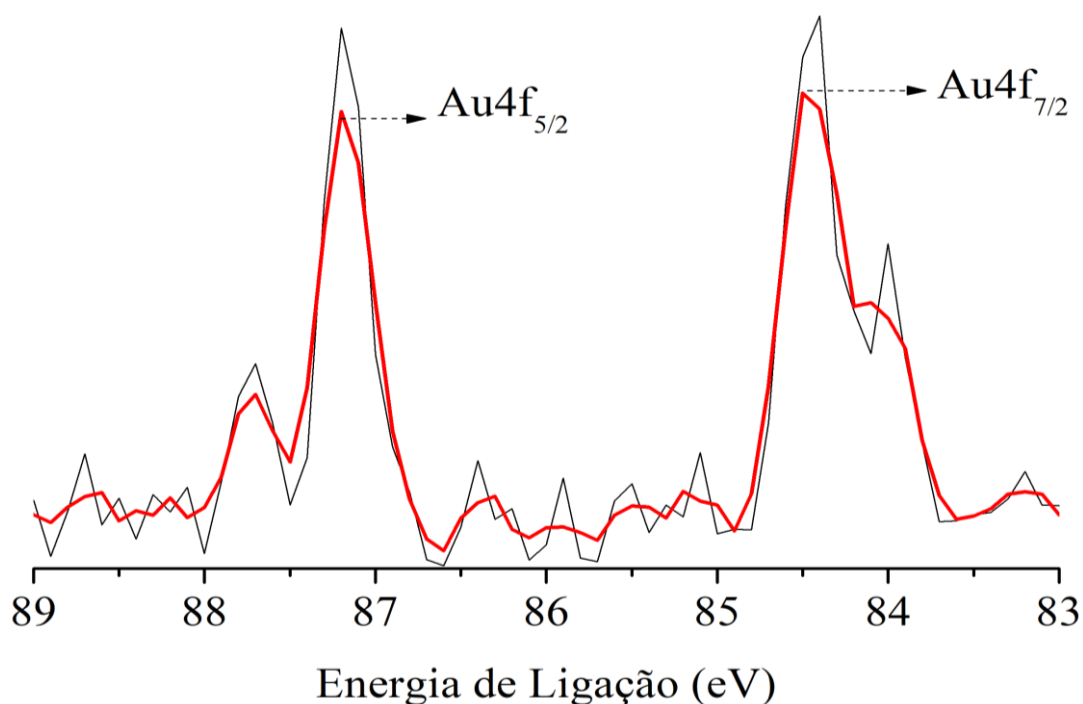


Figura 13. Espectros XPS de alta resolução para níveis de Au4f na amostra A3.

Espectros XPS de alta resolução foram também obtidos com intuito de avaliar os grupos orgânicos presentes nas superfícies dos compósitos. Os espectros de alta resolução para C1s (apêndice A) e O1s (apêndice B) mostraram a presença de grupos característicos da pectina (-COO⁻, -COOH, -COOCH₃) e quitosana (-NHCOCH₃⁻), grupos típicos da pectina e quitosana. Para N1s (apêndice C) não foi possível obter a deconvolução espectral para o completo esclarecimento de todos os sinais referentes aos grupos nitrogenados presentes nas superfícies das amostras. Contudo, foi possível observar picos característicos dos grupos -NH₂ e -NH₃⁺, referente a estrutura da quitosana

parcialmente protonada (LIU; WANG, 2014; MARTINS et al., 2018b). Isso pode ser justificado pois o pH (1,0-2,0) de síntese foi menor que o pKa dos grupos $-NH_2$.

5.5 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR - KBR)

Os ensaios de FTIR-KBr foram realizados para verificação da presença dos grupos funcionais característicos dos polissacarídeos utilizados para obtenção dos compósitos. Os compósitos utilizados para essa análise foram as amostras B e C pois as amostras A tem sua estrutura rompida e maior parte de sua massa é perdida no processo de lavagem. Optamos por não continuar com a amostra A a partir daqui. A Figura 14 apresenta os espectros obtidos para as condições B (Figura 14A) e C (Figura 14B) propostas neste trabalho.

Ao analisar os espectros é possível verificar a presença de bandas largas e intensas entre aproximadamente 3421 a 3449 cm^{-1} as quais são características de grupos hidroxilas ($-OH$), as quais estão presentes em ambos polissacarídeos utilizados na produção dos compósitos. Nessa região também deve aparecer sinais encobertos referentes à alongamentos de $N-H$ do grupo amina da estrutura da quitosana. Outro sinal característico da quitosana nos compósitos são as bandas ocorridas entre 1634 e 1636 cm^{-1} , as quais correspondem aos dobramentos de $N-H$, alongamento de $C-N$ e estiramento das ligações $C=O$ do ânion carboxilato e de amida (QUEIROZ et al., 2015). O estiramento referente aos grupos $C=O$ da amida e dos ácidos carboxílicos que compõem os polissacarídeos apresenta também bandas próximas de 1742 a 1736 cm^{-1} . Pode ainda ser identificado o estiramento assimétrico das ligações $C-O$ em bandas de 1146 a 1148 cm^{-1} . Bandas que correspondem ao alongamento de $C-O$ entre 1065 a 1075 cm^{-1} e as vibrações de flexão que correspondem às hidroxilas entre 1220 a 1230 cm^{-1} também foram reconhecidas (BORKER et al., 2017).

As bandas que aparecem entre 2935 a 2950 cm^{-1} e na faixa de 818 a 838 cm^{-1} são referentes a estiramentos de $C-H$ simétricos e assimétricos em alifáticos e ao dobramento de $C-H$ fora do plano, respectivamente. Além disso, a deformação simétrica de $C-H$ gera as bandas em torno de 1420 a 1418 cm^{-1} (BALACHANDRAN et al., 2013; QUEIROZ et al., 2015). Esses sinais são justificados pelas cadeias carbônicas saturadas presentes nos polissacarídeos.

No geral não houveram diferenças significativas nas bandas reconhecidas para o hidrogel e compósito para as amostras B e C. Contudo, foram observados pequenos deslocamentos para algumas bandas quando comparados os espectros do hidrogel e dos compósitos. Como exemplo tem-se a banda de -OH que sai de 3449 (hidrogel) para 3421 (compósito) na Figura 14A e de 3449 para 3434 cm^{-1} na Figura 14B. Isso pode ser indicativos da coordenação de AuNPs via átomos de oxigênio. A Tabela 4, apresenta valores de número de onda (cm^{-1}) que apresenta os sinais FTIR e as suas respectivas atribuições para as diferentes grupos funcionais presente na superfície dos compósitos.

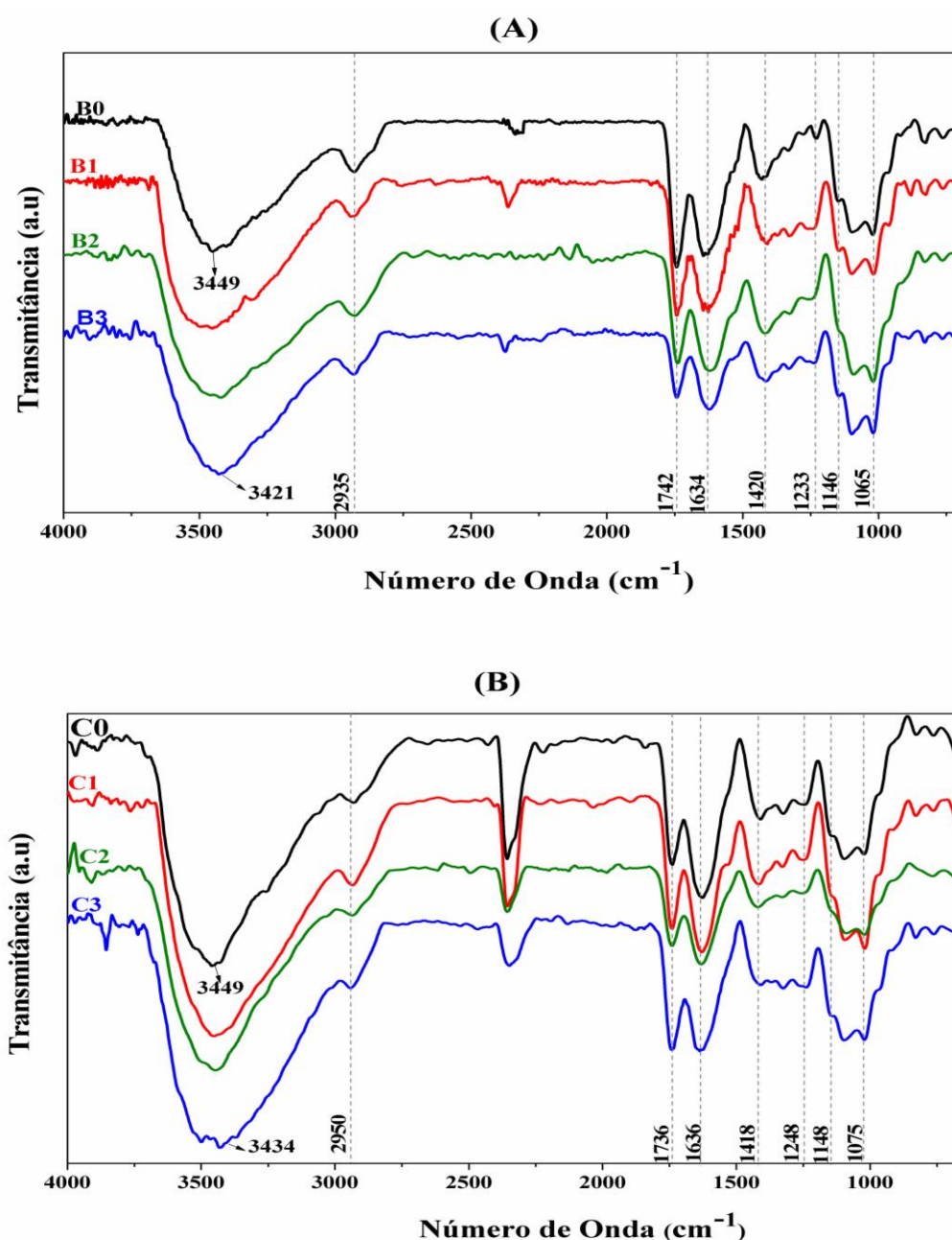


Figura 14. Espectros de FTIR-KBr dos compósitos contendo (A) 2,5% e (B) 2,75% (m/v) de pectina com/sem diferentes concentrações de HAuCl_4 e 1% (m/v) de quitosana. Sendo: B0 e C0 não há adição de

HAuCl₄, B1 e C1 possui 1×10^{-4} mol.L⁻¹, B2 e C2 possui 2×10^{-4} mol.L⁻¹ e, B3 e C3 possui 3×10^{-4} mol.L⁻¹ de HAuCl₄.

Tabela 4. Número de onda (cm⁻¹) e atribuições de grupos funcionais nas superfícies dos compósitos

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuições	Espécie Química
3421 a 3449	Estiramento de OH Alongamento de HN	Água absorvida, Pectina e Quitosana
2935 a 2950	Estiramento CH	Pectina, Quitosana
1742 a 1736	Estiramento C=O	Pectina, Quitosana
1634 e 1636	Dobramento NH estiramento C=O	Pectina, Quitosana
1420 a 1418	Deformação angular CH	Pectina, Quitosana
1220 a 1230	Estiramento C-O, referente vibrações OH	Pectina, Quitosana
1146 a 1148	Estiramentos assimétrico C-O	Pectina, Quitosana
1065 a 1075	Alongamento C-O	Pectina, Quitosana
818 a 838	Dobramento C-H, fora do plano	Pectina, Quitosana

5.6 DIFRAÇÃO DE RAIO-X (DRX)

Na Figura 15 são mostrados os difratogramas obtidos a partir dos compósitos de hidrogéis de pectina-AuNPS/quitosana lavados. Os perfis dos difratogramas são idênticos e apresentam picos estreitos de alta intensidade a $2\theta = 16,72^\circ$, $19,44^\circ$, $27,94^\circ$ e $33,02^\circ$, as quais foram atribuídos a regiões ordenadas formadas por ligações de hidrogênio (grupos hidroxila, amino e carboxílicos) e interações iônicas (grupos $-\text{NH}_3^+$ e carboxilatos) entre as cadeias de pectina/quitosana (TENTOR et al., 2017). Os perfis DRX na obtenção de filmes ternários de quitosana/poli(álcool vinílico)/pectina apresentaram comportamento semelhante (TRIPATHI; MEHROTRA; DUTTA, 2010).

Ainda através dos perfis de DRX, foi possível observar que as AuNPs permaneceram internalizadas na matriz do hidrogel, já que nenhum sinal de ouro foi reconhecido no difratograma. Além disso não foram observadas mudanças quando os difratogramas do hidrogel e compósitos são comparados. Isso indica que a presença de AuNPs na matriz não ocasionou alterações na estrutura do material. Esses resultados corroboram com aqueles observados nas análises de MEV e XPS, onde poucas AuNPs foram reconhecidas na superfície e não foram identificadas mudanças significativas entre as morfologias de superfície dos compósitos e hidrogel.

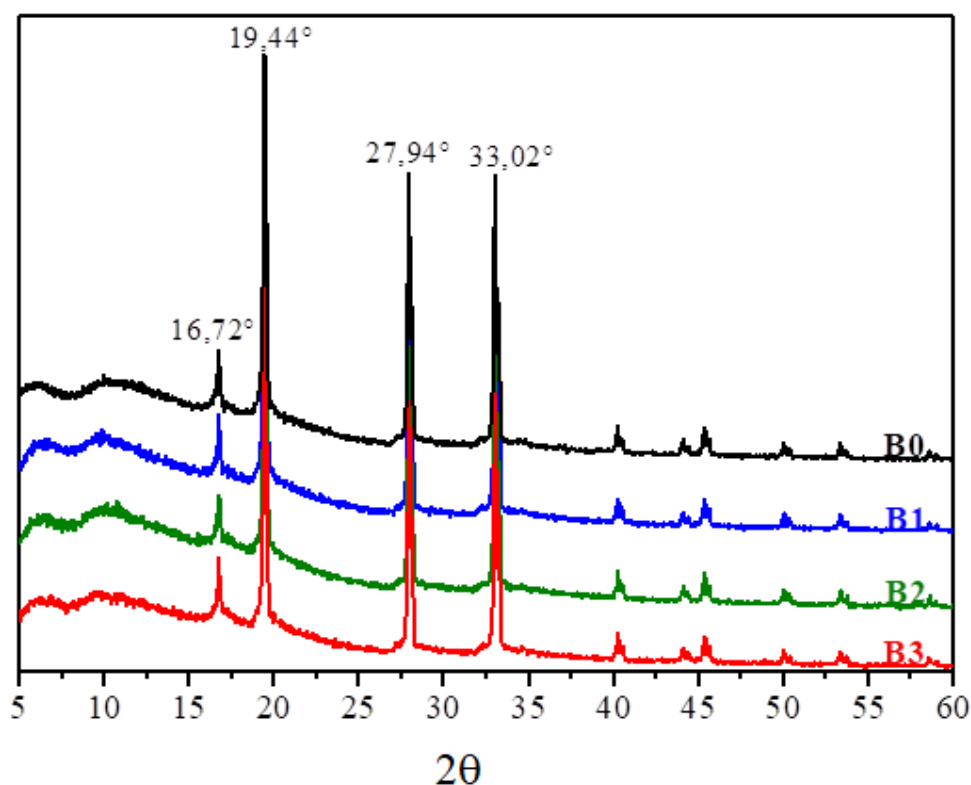


Figura 15. Perfis de DRX para os compósitos com 2,5% (m/v) de pectina e 1% (m/v) de quitosana. Onde: (B0) não há adição de HAuCl_4 , (B1) $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, (B2) $2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e (B3) $3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de HAuCl_4 .

5.7 GRAU DE INTUMESCIMENTO (GI)

O grau de intumescimento (GI %) de um hidrogel depende da composição química dos compósitos e da condição de pH do meio, a qual pode atuar protonando ou não grupos presentes nas cadeias poliméricas. Nesse ensaio os compósitos foram imersos em solução de PBS com $\text{pH} = 7,4$. Através da Figura 16 foi possível observar que as amostras B0 (4465%) e B3 (2976%) tiveram diferença significativa entre si, enquanto que entre C0 (3977%) e C3 (4537%) não foram estatisticamente diferentes em termos de GI.

Para a amostra B3, estatisticamente diferente de todas, as AuNPs aprisionadas na matriz do compósito parecem ter atuado, em uma boa extensão, como reticulantes das cadeias poliméricas. Isso deve ter aumentado a rigidez da matriz e dificultado o intumescimento do material. Um efeito semelhante tem sido observado em géis reticulados *in situ* com AuNPs (REN, 2016). Esse efeito não foi perceptível para a amostra C3, onde foi empregada quantidade de AuNPs semelhantes. Isso possivelmente ocorreu, pois, a quantidade de pectina em C3 é 10% (em massa) maior em relação à B3.

Isso resulta em uma menor quantidade de AuNPs com respeito a quantidade de pectina. Por isso, o efeito da reticulação das cadeias por AuNPs, deve ter eficiência menor na amostra C3. Além disso, por possuir maior teor de pectina, há uma habilidade maior da amostra C3 em captar água. Esse efeito possivelmente tenha se sobressaído frente a reticulação causada pelas AuNPs.

No geral o intumescimento dos materiais ocorreu devido à alta concentração de pectina nos compósitos, isto é 2,5 e 2,75% (m/v) para as amostras B e C, respectivamente. A pectina é um polissacarídeo muito hidrofílico devido a disponibilidade de grupos oxigenados aniônicos livres (pH = 7,4) ao longo de sua cadeia, assim como a ocorrência de ligações de hidrogênio com grupos oxigenados as quais favorecem interações hidrofílicas e captação de água. Vale ressaltar que a superfície de materiais hidrofílicos pode favorecer o crescimento e reprodução celular.

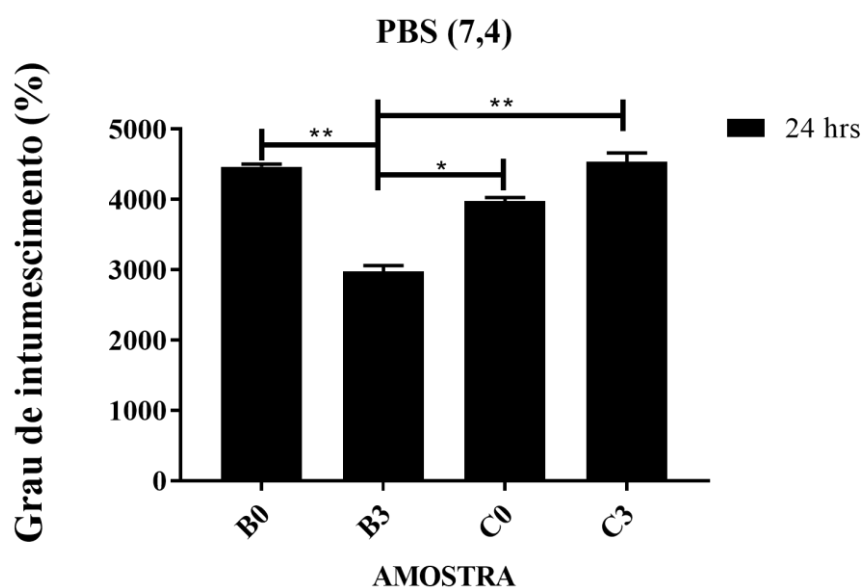


Figura 16. Grau de intumescimento (GI%) dos compósitos de pectina-AuNPs/quitosana avaliados em PBS (pH = 7,4) por 24 h, a 37°C. Sendo que: B0 e C0 não há adição de H_{AuCl}₄, B3 e C3 possui 3x10⁻⁴ mol.L⁻¹ de H_{AuCl}₄. Resultados significativamente diferentes implicam p ≤ 0,01 (**) e p ≤ 0,05 (*).

5.8 DESINTEGRAÇÃO DOS COMPÓSITOS

Os perfis de desintegração dos compósitos lavados e secos, foram avaliados nos intervalos de 1, 3, 5, 7 e 14 dias em PBS com pH = 7,4. A Figura 17 permite verificar que os compósitos com maior teor de pectina (C0 e C3) apresentaram perda de massa maiores.

Até o terceiro dia, cerca de ~30% a 40% de massa foi perdida para essas amostras. No 14º dia a desintegração atingiu aproximadamente 60% para amostra C0. Por outro lado, os compósitos B0 e B3, se mostraram mais estáveis contra o processo de desintegração em PBS no mesmo intervalo de dias. Para ambos os compósitos apresentaram ótima estabilidade durante os 14 dias de teste, os quais apresentaram desintegração na faixa de 30%. Possivelmente o maior excesso de cargas negativas (íons carboxilatos produzidos no pH = 7,4), principalmente observado na amostra C3 deve ser responsável pela sua menor estabilidade. As cadeias tendem a apresentar uma menor interação entre si por conta da maior repulsão eletrostática (DE OLIVEIRA et al., 2019; MARTINS et al., 2018a).

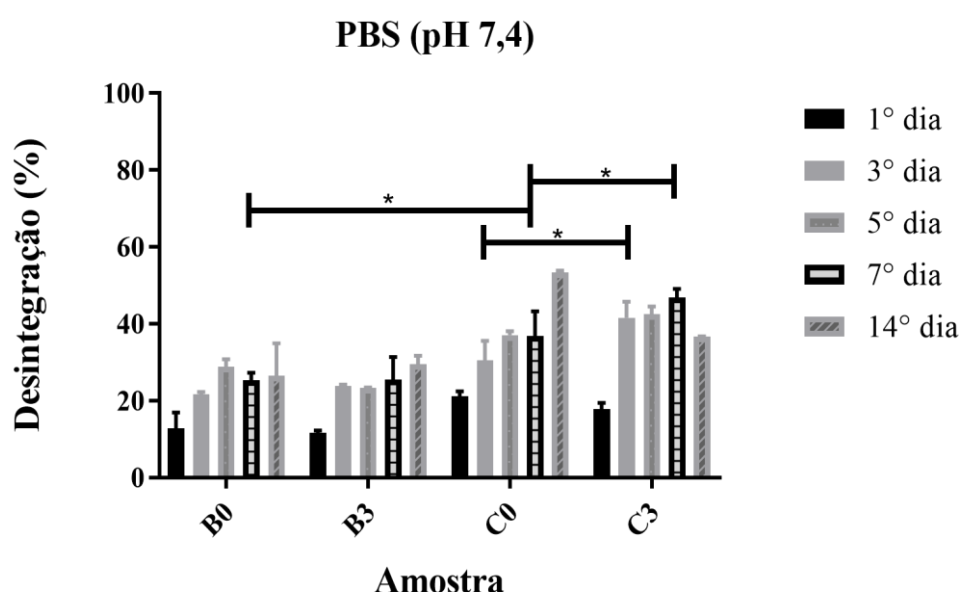


Figura 17. Desintegração (%) dos compósitos de Pectina-AuNPs/Quitosana avaliados em PBS por 14 dias. Sendo que: B0 e C0 não há adição de H₂AuCl₄, B3 e C3 possui 3x10⁻⁴ mol.L⁻¹ de H₂AuCl₄. Resultados significativamente diferentes implicam p ≤ 0,05 (*).

O estudo de desintegração dos compósitos demonstrou que houve boa interação entre as cadeias poliméricas para amostras. Isso auxiliou na manutenção da estabilidade em PBS mesmo após 14 dias de teste, principalmente no que diz respeito as amostras B. Além disso, foi possível observar que a presença de AuNPs *in situ* na matriz dos compósitos de pectina-AuNPS/quitosana não modificou de maneira significativa o perfil de desintegração quando comparado com hidrogel puro. Com base nos resultados de estabilidade (em PBS a pH 7,4), os compósitos mostram-se promissores para aplicação de crescimento celular para condição requerida

5.9 PONTO DE CARGA ZERO (pH_{pcz})

O ensaio pH_{pcz} foi realizado para as amostras B0, B3, C0 e C3 com intuito de determinar o pH no qual a carga da superfície líquida do compósito é zero. O pH_{pcz} dos compósitos estudados foi determinado como sendo o pH final constante obtido após a imersão nos diferentes meios. Como pode ser observado na Figura 18, todos os compósitos apresentaram pontos de carga zero situados em pH_{pcz} ≈ 4,0.

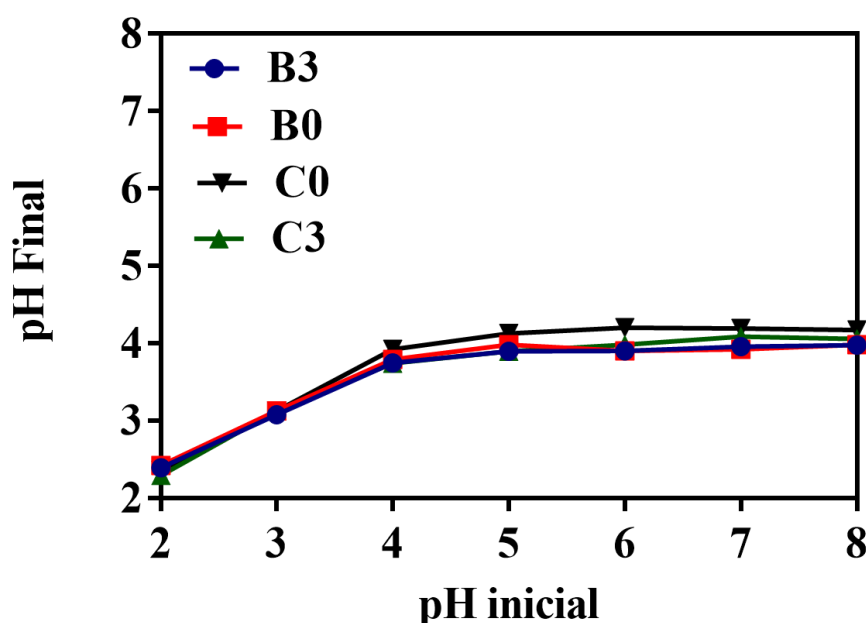


Figura 18. Resultado da determinação do pH_{pcz} para os compósitos de Pectina-AuNPs/Quitosana avaliados por 24 horas. Sendo que: B0 e C0 não há adição de HAuCl₄, B3 e C3 possui 3×10^{-4} mol.L⁻¹.

Os valores do efeito do pH_{pcz} dependerá da composição, condições da amostra e das particularidades de sua superfície (ALFREDO et al., 2015). Vale ressaltar que os compósitos são constituídos de 3,8 e 4,1 vezes mais massa de pectina do que quitosana para as amostras B e C, respectivamente. Contudo, a variação no teor de pectina não ocasionou variações significativas de pH_{pcz} entre amostras.

O conhecimento do pH_{pcz} é importante para determinar o tipo de densidade de cargas esperada para a superfície do material em função do pH do meio na qual ele é imerso. Assim, quando o pH do meio for menor do que o pH_{pcz}, a superfície dos compósitos torna-se positiva. Isso vai ocorrer devido a adsorção do excesso de H⁺, ocasionando a protonação dos grupos aminos presentes na estrutura da quitosana, além da perda de grupos carboxilatos por protonação. Isso tende a favorecer a adsorção/interação com espécies aniônicas. Por outro lado, quando o pH da solução é

maior que o pHpcz, a superfície dos compósitos torna-se carregada negativamente. Isso ocorre, pois, grupos carboxílicos são ionizados e os grupos aminos são desprotonados. Isso favorece a adsorção de espécies catiônicas (ABREU et al., 2008; DAYANANDA et al., 2014). Aplicações biomédicas por vezes requer essa avaliação.

5.10 ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR

Para que os compósitos sejam utilizados como suporte de proliferação celular de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (células ADSC), eles não devem apresentar citotoxicidade. Assim, a viabilidade celular foi determinada pelo método AlamarBlue. Os ensaios foram realizados depois de 4 dias de incubação e as células foram semeadas nas amostras a uma densidade muito baixa (5000 por poço) a 37°C. A Figura 19 apresenta os resultados de viabilidade celular obtidos.

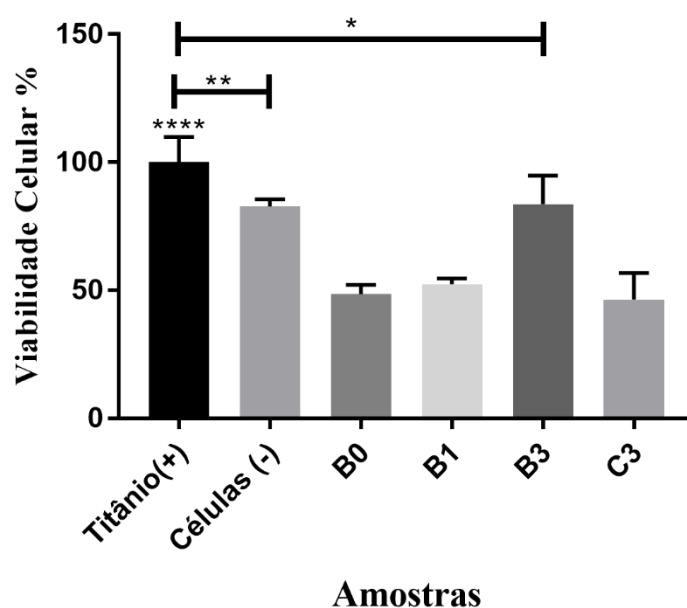


Figura 19. Resultados de viabilidade celular promovidos pelos compósitos em comparação com controle negativo (células) e controle positivo (titânio), sobre células ADSCs após 4 dias de análise. Sendo que: B0 não há adição de HAuCl_4 , B1 $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e, B3 e C3 $3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de HAuCl_4 . Os termos *, ** e **** indicam resultados significativamente diferentes com $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,0001$.

A viabilidade celular foi tomada como sendo 100% para os controles negativo e positivo. Assim, a viabilidade celular promovida pelos compósitos foi comparada com a viabilidade celular induzida pela cultura de células (controle negativo) e pelo titânio

(controle positivo). Os compósitos B0, B1 e C3 proveram viabilidade celular em torno de 50% após 4 dias de incubação, se comparado com o controle negativo. A viabilidade celular dessas amostras fora menor do que para amostra B3 (84%), comparando com o controle negativo (82%). A melhor citocompatibilidade de B3 frente às outras amostras pode ser justificada com base na sua relativa menor hidrofiliçidade (GI de 2976% contra aproximadamente 4000-4500% das outras amostras em PBS). Se a hidrofiliçidade é muito elevada, isso pode dificultar ou até suspender a aderência das células devido à alta difusão das moléculas água no equilíbrio (MARTINS et al., 2018b). Um balanço no caráter hidrofílico é importante para a manutenção de boa viabilidade celular. Outro ponto favorável para a amostra B3 é que ela é estável por um tempo maior em PBS (vide teste de desintegração), a qual é o fluido utilizado nos testes de citocompatibilidade. Os dois aspectos (maior estabilidade em PBS e menor GI) estão associadas com a presença de AuNPs. Como já discutido, elas devem funcionar como pontos de reticulação na rede deixando-a mais rígida. Isso mostra que a presença de nanopartículas na matriz do hidrogel teve um papel importante para a produção de um substrato mais citocompatível. Deve ser ressaltado que o efeito da presença das AuNPs nas características do material foi mais pronunciado na amostra B3, a qual deve ser justificado pois é nela que ocorre a maior relação precursor de ouro/pectina.

O controle positivo (titânio) também foi testado devido sua baixa toxicidade e possuir grande potencial para proliferar e promover o crescimento de células (DE VITERI e FUENTES, 2013). Se comparado com os discos de titânio, a viabilidade celular para amostra B3 foi, novamente, a maior (viabilidade celular de 84%) dentre todas amostras testadas. Isso indica que a amostra B3 se mostrou com um grande potencial para aplicação como matrizes para crescimento celular.

Heo, et al. (2014), também relataram o aumento da viabilidade celular para células ADSC em hidrogéis de gelatina metacrilada com nanopartículas de ouro. Demonstrando que o aumento da concentração de AuNPs na matriz do hidrogel é proporcional a taxa de proliferação celular comparado com o hidrogel sem AuNPs (HEO et al., 2014). Em outro trabalho, foi mostrado que hidrogéis de quitosana, reticulados quimicamente com glutaraldeído, tem a viabilidade celular de ADSCs, pelo método MTT, de 90% comparado ao controle somente cultura de células em PBS (DEBNATH et al., 2015). Com isso, os compósitos de pectina-AuNPs/quitosana, avaliado no presente estudo, mostrou desempenho destacado e um promissor *scaffolds*.

Deve ser observado que a boa compatibilidade de hidrogéis de pectina-AuNPs/quitosana ocorre pois nesses materiais são encontradas certa similaridade entre os grupos químicos presentes nas cadeias poliméricas com aquelas das proteínas de membrana celular.

5.11 TERMOSENSIBILIDADE

A Tabela 4 apresenta tanto a temperatura como o tempo para atingir a transição sol-gel. Esses parâmetros foram determinados pelo método de inclinação. Após a gelificação, os compósitos apresentaram comportamento de reversibilidade quando imersos em um banho de água a 65°C. Contudo, se lavados, os compósitos perdem a reversibilidade térmica. Isso se deve a reorganização das cadeias dos polissacarídeos durante a mudança lenta do pH devido a lavagem. Isso deve propiciar o aumento das interações eletrostáticas (derivadas principalmente da desprotonação de grupos ácido carboxílico), as quais dificultam a reversibilidade da fase gel para fase fluída (DE OLIVEIRA et al., 2019).

As temperaturas sol-gel dos compósitos ocorreram na faixa de 49 a 53°C e o tempo de gelificação ficaram entre 1,2 e 1,8 minutos. Claramente é possível observar que a presença de AuNPs faz com que o gel fique mais estável, uma vez que a temperatura de sol-gel aumenta com o aumento da quantidade de AuNPs presentes na matriz. Isso ficou bastante evidente para amostra B3. Esse resultado corrobora com os testes de desintegração (B3 foi a mais resistente ao longo de 14 dias) e de GI (B3 teve menor valor) que mostraram que essa amostra é mais rígida possivelmente pelo fato das AuNPs atuarem como reticulantes na matriz. Essas características inclusive devem ter contribuído para excelente citocompatibilidade da amostra B3, como já sugerido.

Tabela 5. Temperatura e tempo necessários para atingir a transição de fase sol-gel dos compósitos, com 2,5% (m/v) de pectina e 1% (m/v) de quitosana. Onde: (B0) não há adição de H_{AuCl}₄, (B1) 1x10⁻⁴ mol.L⁻¹, (B2) 2x10⁻⁴ mol.L⁻¹ e (B3) 3x10⁻⁴ mol.L⁻¹ de H_{AuCl}₄.

Amostra	Temperatura sol-gel (°C)	Tempo (min)
B0	49±1	1,2±0,05
B1	51±1	1,4±0,05
B2	51±1	1,5±0,05
B3	53±1	1,8±0,05

O tempo de gelificação dos compósitos cresceu conforme houve o aumento de AuNPs, sendo que foram obtidos tempos de 1,2 e 1,8 min para B0 (sem adição de HAuCl_4) e B3 ($3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1} \text{ HAuCl}_4$), respectivamente. Segundo Baei et al. (2016), o aumento da concentração de AuNPs tende atrasar o tempo de gelificação pela saturação dos grupos carbonilas. Além disso, possivelmente ocorrerá um retardo no tempo de organização das cadeias e pontos de reticulação que promovem as efetivas interações entre as cadeias de pectina-AuNPs e quitosana. Assim, apesar de mais rígidos, os compósitos com maior concentração de AuNPs deve demorar mais tempo para gelificar. Isso indica mais uma vez que o material nanoparticulado tem papel preponderante na reticulação e gelificação.

5.12 ESTUDO DE ESTABILIDADE

A análise de estabilidade de AuNPs sintetizadas pelo método de Turkevich, em pectina e a internalizadas na matriz do hidrogel (compósito B3) foi realizada em diferentes intervalos de tempo de 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias. A estabilidade foi acompanhada visualmente e espectrofotometricamente em diferentes temperaturas de armazenamento a 5 e 25°C.

Pelo método Turkevich as nanopartículas sintetizadas mostraram-se com diâmetros médios similares, em ambas as temperaturas avaliadas, após 90 dias de estudo. Isso é visualmente demonstrado pela Figura 20, onde são apresentadas imagens fotográficas do sistema após 60 dias de estocagem sob diferentes temperaturas (Figuras 20B e 20C). O indicativo avaliado foi que, após a rápida alteração inicial de cor do primeiro até o 15º dia, os sistemas adquiriram uma tonalidade final semelhante para ambas do 15º até os 60º dias. Mesmo após 90 dias, a tonalidade permaneceu a mesma em ambas amostras. Sendo assim, as características geométricas (consequentemente as propriedades do nanomaterial) não mudaram significativamente com a variação temperatura de estocagem. Contudo, ainda avaliando a Figura 20B, observa-se a presença de material precipitado no fundo da cubeta com armazenamento sob temperatura mais alta. Isso indica menor estabilidade nessa condição. Parte do material não consegue se manter em suspensão, sofre aglomeração e coalesce. Uma avaliação mais detalhada, através de espectros de absorção de AuNPs obtidas pelo método Turkevich, mostrou que elas realmente permaneceram mais estáveis quando armazenadas à 5°C se comparada a 25°C (Figura 21

A). Os valores de absorvância máxima permanecem aproximadamente constantes (sem variação significativa) ao longo dos dias, sob 5°C. Por outro lado, sob 25°C, há uma clara redução da absorvância (diminuição da população de AuNPs por coalescência) e um pequeno deslocamento no máximo, 518 para 521 nm (associado com mudanças geométricas das AuNPs que indicam perda de estabilidade).

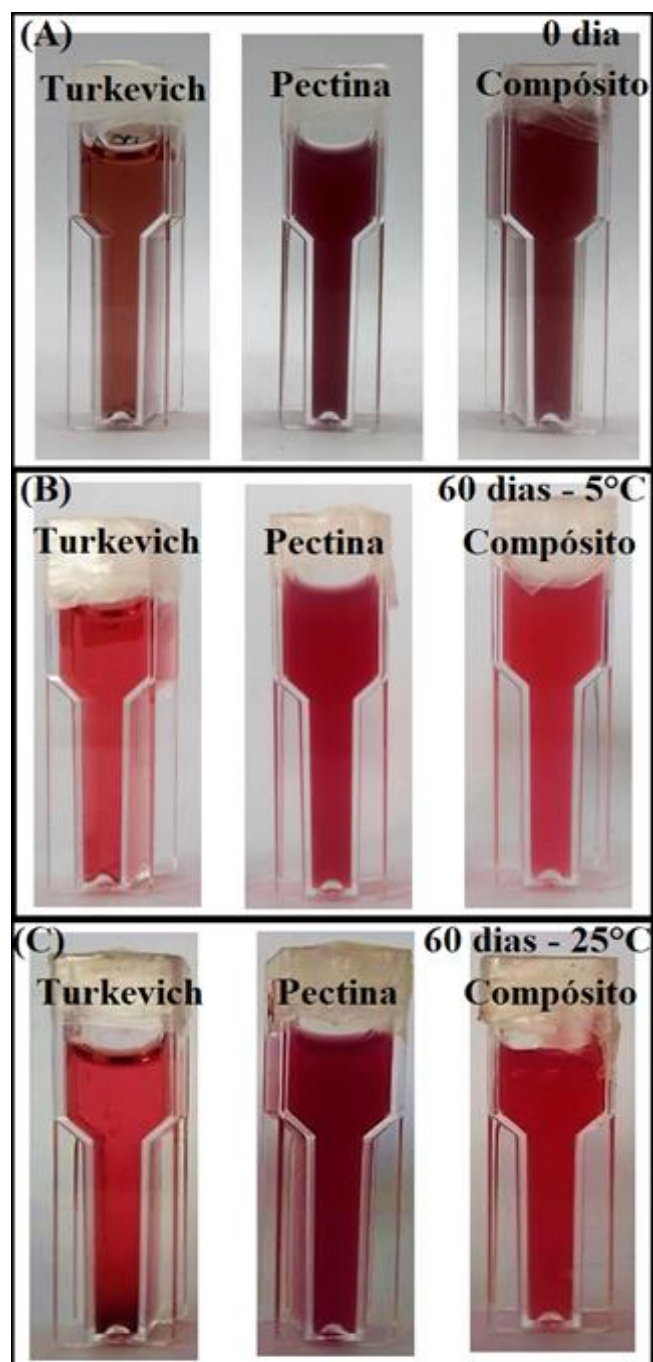


Figura 20. Imagens fotográficas das amostras de estudo de estabilidade de AuNPs em diferentes meios para A) 0 dia (dia da síntese), B) após 60 dias, sob 25°C e C) após 60 dias, sob 5°C.

Em comparação, a amostra de AuNPs obtidas em pectina visualmente teve uma alteração contínua de tonalidade de cor dentro dos primeiros 30 dias. Isso possivelmente deve está associado ao fato de que, em pectina, a cinética de redução do precursor de ouro é mais lenta e permanece ocorrendo por todo esse período. Além disso, após decorridos 60 dias, verificou-se que a tonalidade da suspensão não foi distinta se comparadas as duas temperaturas de armazenamento testadas, sob 5°C e 25°C (exatamente como ocorreu para AuNPs obtidas por Turkevich). Não houve sinal de coalescência e isso indica que a estabilidade do material nanoparticulado é maior em meio de pectina. Um perfil bastante semelhante foi observado para AuNPs em meio do compósito.

Avaliando espectros de absorvância para AuNPs em pectina e no compósito percebe-se que houve aumento significativo na absorvância, sob 5°C, alcançando um máximo até os 30 e 45 dias de armazenamento para as amostras de AuNPs em pectina e em compósito, respectivamente. Sob 25°C, os máximos de absorvância foram alcançados em 30 e 15 dias, respectivamente. Esses resultados confirmam que a cinética de redução é mais lenta se AuNPs forem produzidas em pectina, tal como já tinha sido sugerido. Não foi verificado um aumento da velocidade de produção para as AuNPs em pectina, se armazenadas em temperaturas maiores. Contudo, quando reticuladas no hidrogel, o acréscimo da temperatura favoreceu uma cinética mais rápida, com máximo já obtido em 15 dias. Possivelmente, o aumento da densidade de cadeias alcançada com a reticulação somada a presença de grupos redutores extras da quitosana devem ter contribuído para esse resultado quando mais energia estava disponível no sistema.

Um outro aspecto a se destacar é que, para as AuNPs presentes em pectina e na matriz do compósito, a absorvância decresce após um máximo ter sido obtido. Isso pode ser atribuído ao fato de que ao longo do tempo parte das AuNPs são re-oxidadas até um equilíbrio ser estabelecido durante o ajuste das cadeias para alcançar a acomodação final. Finalmente, o alargamento das bandas LSPR nesses sistemas (se comparadas com as bandas obtidas para AuNPs em Turkevich) deve ocorrer devido ao espalhamento de luz ocasionado pelas cadeias poliméricas.

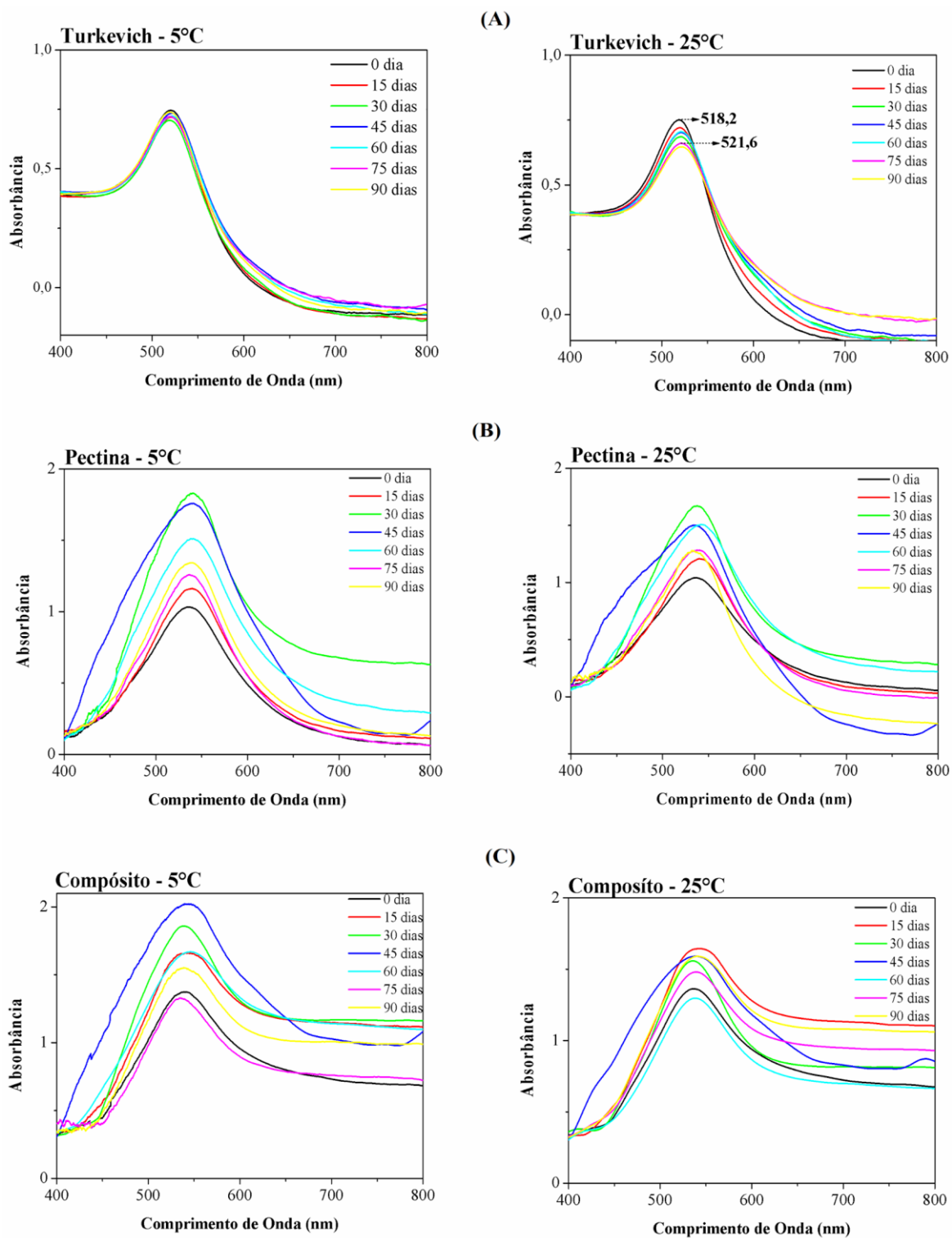


Figura 21. Espectros do visível de AuNPs sintetizadas pelo método de (A) Turkevich e por (B) Pectina, e a presença (F) na matriz do compósito mostrando estabilidade em função do tempo em dias no armazenamento de 5°C e 25°C.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou que foi possível realizar através de um método simples a síntese *in situ* de nanopartículas de ouro em pectina com alto grau de metoxilação, para adquirir, pela sua conjugação com quitosana, compósitos estáveis de pectina-AuNPs/quitosana. Espectros no visível mostraram que o diâmetro médio das partículas obtidas em pectina diminuiu com o aumento da concentração da solução de precursor de ouro. Imagens de MEV e XPS mostraram ainda que a concentração de AuNPs na superfície dos hidrogéis é bastante baixa, sugerindo a sua quase completa encapsulação na matriz polimérica. Através de análises por FTIR e XPS de alta resolução foi possível reconhecer a presença de sinais característicos dos grupos dos polissacarídeos nos compósitos. Além de indicaram que a pectina-AuNPs e quitosana interagem eficientemente para formar hidrogéis compactos, estáveis ao processo de desintegração ao longo de 14 dias e com alto grau de intumescimento (de 3500 a 4500%).

Além disso, o compósito contendo a maior concentração de nanopartículas de ouro na condição intermediária de pectina (amostra B3 com 2,5% (m/v)) demonstrou grande potencial para ser utilizada como suporte para crescimento celular. Isso porque os estudos de citocompatibilidade mostraram que nessa condição (maior relação de AuNPs/pectina dentre as condições testadas), obteve-se o material mais citocompatível. A presença de AuNPs desse compósito resultou em cerca de 84% de viabilidade celular, comparado com controle positivo (titânio). Amostras sem AuNPs ou com relação AuNPs/pectina relativamente menor alcançaram, no máximo, em torno de 50% de células viáveis comparando com o mesmo controle.

O estudo de estabilização de AuNPs demonstrou que a internalização na matriz dos compósitos manteve as nanopartículas estáveis. Contudo uma cinética de redução dos íons de Au³⁺ foi mais lenta do que aquela observada para síntese pelo método de Turkevich. As AuNPs no compósito ainda demonstraram que alcançam um máximo de produção e são re-oxidadas durante a organização das cadeias poliméricas até alcançar um equilíbrio. Para os compósitos a 25°C foi alcançado nos primeiros 15 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. O. M. S. et al. Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling behavior of alginate-chitosan hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 2, p. 283–289, 2008.

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

AL-NASIRY, S. et al. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability...pdf. v. 22, n. 5, p. 1304–1309, 2007.

ALAQAD, K.; SALEH, T. A. Gold and Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Characterization Routes and Applications towards Drugs. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 6, n. 4, 2016.

ALFREDO, A. P. C. et al. Adsorção de azul de metileno em casca de batata utilizando sistemas em batelada e coluna de leito fixo. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1909–1920, 2015.

ANA HUERGO, M. et al. The surface chemistry of near-infrared resonant gold nanotriangles obtained via thiosulfate synthesis. **Applied Surface Science**, 2018.

ANTONINO, R. S. C. M. D. Q. et al. Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). **Marine Drugs**, v. 15, n. 5, p. 1–12, 2017.

ASLAN, K.; PÉREZ-LUNA, V. H. Surface Modification of Colloidal Gold by Chemisorption of Alkanethiols in the Presence of a Nonionic Surfactant. **Langmuir**, v. 18, n. 16, p. 6059–6065, ago. 2002.

BAEI, P. et al. Electrically conductive gold nanoparticle-chitosan thermosensitive hydrogels for cardiac tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 63, p. 131–141, 2016.

BALACHANDRAN, Y. L. et al. Differently Environment Stable Bio-Silver Nanoparticles: Study on Their Optical Enhancing and Antibacterial Properties. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.

BORKER, S. et al. Engineering of pectin-reduced gold nanoparticles for targeted delivery of an antiviral drug to macrophages: in vitro and in vivo assessment. **Gold**

Bulletin, v. 50, n. 3, p. 235–246, 2017.

CHEN, R. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces In situ formation of chitosan – gold hybrid hydrogel and its application for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 97, p. 132–137, 2012.

CORDEIRO, M. et al. Gold Nanoparticles for Diagnostics : Advances towards Points of Care. n. i, 2016.

DAYANANDA, D. et al. Preparation of CaO loaded mesoporous Al₂O₃: Efficient adsorbent for fluoride removal from water. **Chemical Engineering Journal**, v. 248, p. 430–439, 2014.

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.

DEBNATH, T. et al. Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells grown on chitosan hydrogel. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–14, 2015.

DEVENDIRAN, R. M. et al. Green synthesis of folic acid-conjugated gold nanoparticles with pectin as reducing/stabilizing agent for cancer theranostics†. **RSC Advances**, v. 6, n. 35, p. 29757–29768, 2016.

FACCHI, D. P. et al. **Polysaccharide-Based Materials Associated with or Coordinated to Gold Nanoparticles: Synthesis and Medical Application**. [s.l.: s.n.]. v. 24

FELDHEIM, D. L.; FOSS, C. A. **Metal nanoparticles : synthesis, characterization, and applications**. [s.l.] Marcel Dekker, 2002.

GAO, W. et al. Nanoparticle-Hydrogel: A Hybrid Biomaterial System for Localized Drug Delivery. **Annals of biomedical engineering**, v. 44, n. 6, p. 2049–61, 2016.

GUO, R. et al. Composites of Polymer Hydrogels and Nanoparticulate Systems for Biomedical and Pharmaceutical Applications. **Nanomaterials**, v. 5, n. 4, p. 2054–2130, 2015.

HEO, D. N. et al. Enhanced bone regeneration with a gold nanoparticle-hydrogel complex. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 11, p. 1584–1593, 2014.

HERIZCHI, R. et al. Current methods for synthesis of gold nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 596–602, 2016.

- HUANG, H.; YANG, X. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: A green method. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 15, p. 2627–2631, 2004.
- LE RU, E. C.; ETCHEGOIN, P. G. (PABLO G. **Principles of surface-enhanced Raman spectroscopy : and related plasmonic effects**. [s.l.] Elsevier, 2009.
- LESUFFLEUR, A. et al. **Laser-illuminated nanohole arrays for multiplex plasmonic microarray sensing**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://nanobio.umn.edu>>. Acesso em: 6 set. 2018.
- LI, N.; ZHAO, P.; ASTRUC, D. Anisotropic gold nanoparticles: Synthesis, properties, applications, and toxicity. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 7, p. 1756–1789, 2014.
- LI, Q.; DUNN, E. T.; GRANDMAISON, E. W. *Compatible Polymers*. 1992.
- LIU, H.; WANG, C. Chitosan scaffolds for recyclable adsorption of Cu(ii) ions. **RSC Advances**, v. 4, n. 8, p. 3864–3872, 2014.
- LIU, X. et al. Multidentate zwitterionic chitosan oligosaccharide modified gold nanoparticles: Stability, biocompatibility and cell interactions. **Nanoscale**, v. 5, n. 9, p. 3982–3991, 2013.
- MARTINS, J. G. et al. Durable pectin/chitosan membranes with self-assembling, water resistance and enhanced mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 188, p. 136–142, 2018a.
- MARTINS, J. G. et al. Pectin-chitosan membrane scaffold imparts controlled stem cell adhesion and proliferation. **Carbohydrate Polymers**, v. 197, n. April, p. 47–56, 2018b.
- MEDEIROS BORSAGLI, F. G. L. et al. O-carboxymethyl functionalization of chitosan: Complexation and adsorption of Cd (II) and Cr (VI) as heavy metal pollutant ions. **Reactive and Functional Polymers**, v. 97, n. Ii, p. 37–47, 2015.
- MONTEIRO, J. P. et al. Effect of periodicity on the performance of surface plasmon resonance sensors based on subwavelength nanohole arrays. **Sensors and Actuators B**, v. 178, p. 366–370, 2013.
- MORRIS, G. A et al. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews Polysaccharide drug delivery systems based on pectin and chitosan*. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, n. May, p. 37–41, 2013.

NEUFELD, L.; BIANCO-PELED, H. Pectin–chitosan physical hydrogels as potential drug delivery vehicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 852–861, 2017.

NIGOGHOSSIAN, K. et al. Orange pectin mediated growth and stability of aqueous gold and silver nanocolloids. **Applied Surface Science**, v. 341, p. 28–36, 2015.

NOLAN, H. et al. Metal nanoparticle-hydrogel nanocomposites for biomedical applications – An atmospheric pressure plasma synthesis approach. **Plasma Processes and Polymers**, v. 15, n. 11, p. 1–10, 2018.

NORDBY, M. H. et al. Thermoreversible gelation of aqueous mixtures of pectin and chitosan. Rheology. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 2, p. 337–343, 2003.

NOREEN, A. et al. Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 254–272, 2017.

NOTARIANNI, M. et al. Plasmonic effect of gold nanoparticles in organic solar cells. **Solar Energy**, v. 106, p. 23–37, 2014.

PARK, Y. et al. Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. **IET Nanobiotechnology**, v. 5, n. 3, p. 69, 2011.

PATEL, A. et al. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 5, p. 595–601, 2014.

QUEIROZ, M. F. et al. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? **Marine Drugs**, v. 13, n. 1, p. 141–158, 2015.

REENA, K. et al. Green Synthesis of Pectin-Gold-PLA-PEG-PLA Nanoconjugates: *In Vitro* Cytotoxicity and Anti-Inflammatory Activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 17, n. 7, p. 4549–4557, 2017.

REN, F. Synthesis of Gold Nanoparticle-Hydrogel Nanocomposites with Controlled Cytotoxicity and Unique Cell-Adhesive Properties. n. September, p. 132, 2016.

RIBEIRO, M. et al. Antibacterial silk fibroin/nanohydroxyapatite hydrogels with silver and gold nanoparticles for bone regeneration. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 231–239, 2017.

RODRIGUES, M. et al. In situ template synthesis of gold nanoparticles using a bis-

imidazolium amphiphile-based hydrogel. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 446, p. 53–58, 2015.

SHARMA, V.; PARK, K.; SRINIVASARAO, M. Colloidal dispersion of gold nanorods: Historical background, optical properties, seed-mediated synthesis, shape separation and self-assembly. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 65, n. 1–3, p. 1–38, maio 2009.

SHUKLA, V. K. et al. Green synthesis of nanosilver as a sensor for detection of hydrogen peroxide in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 213–214, p. 161–166, 2012.

SIMONACCI, F.; BERTOZZI, N.; RAPOSIO, E. Off-label use of adipose-derived stem cells. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 24, p. 44–51, 2017.

SUN, L. et al. One pot synthesis of gold nanoparticles using chitosan with varying degree of deacetylation and molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, v. 178, p. 105–114, 2017.

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.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and Uses of Pectin - A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 47–73, 1997.

THI, P. LE et al. Catechol-rich gelatin hydrogels in situ hybridizations with silver nanoparticle for enhanced antibacterial activity. **Materials Science & Engineering C**, p. #pagerange#, 2018.

TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, P. K. Preparation and physicochemical evaluation of chitosan/poly(vinyl alcohol)/pectin ternary film for food-packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 3, p. 711–716, 2010.

TURKEVICH, JOHN; COOPER, P. H. J. A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 55, n. c, p. 55–75, 1951.

VARAPRASAD, K. et al. A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 79, p. 958–971, 2017.

VETCHINKINA, E. et al. Green synthesis of nanoparticles with extracellular and intracellular extracts of basidiomycetes. **PeerJ**, v. 6, p. e5237, 2018.

WAHID, F. et al. Recent advances in antimicrobial hydrogels containing metal ions and metals/metal oxide nanoparticles. **Polymers**, v. 9, n. 12, 2017.

WILLETS, K. A.; VAN DUYN, R. P. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 267–297, maio 2007.

WU, X. et al. Ac ce us cr t. **Applied Surface Science**, v. 331, p. 210–218, 2015.

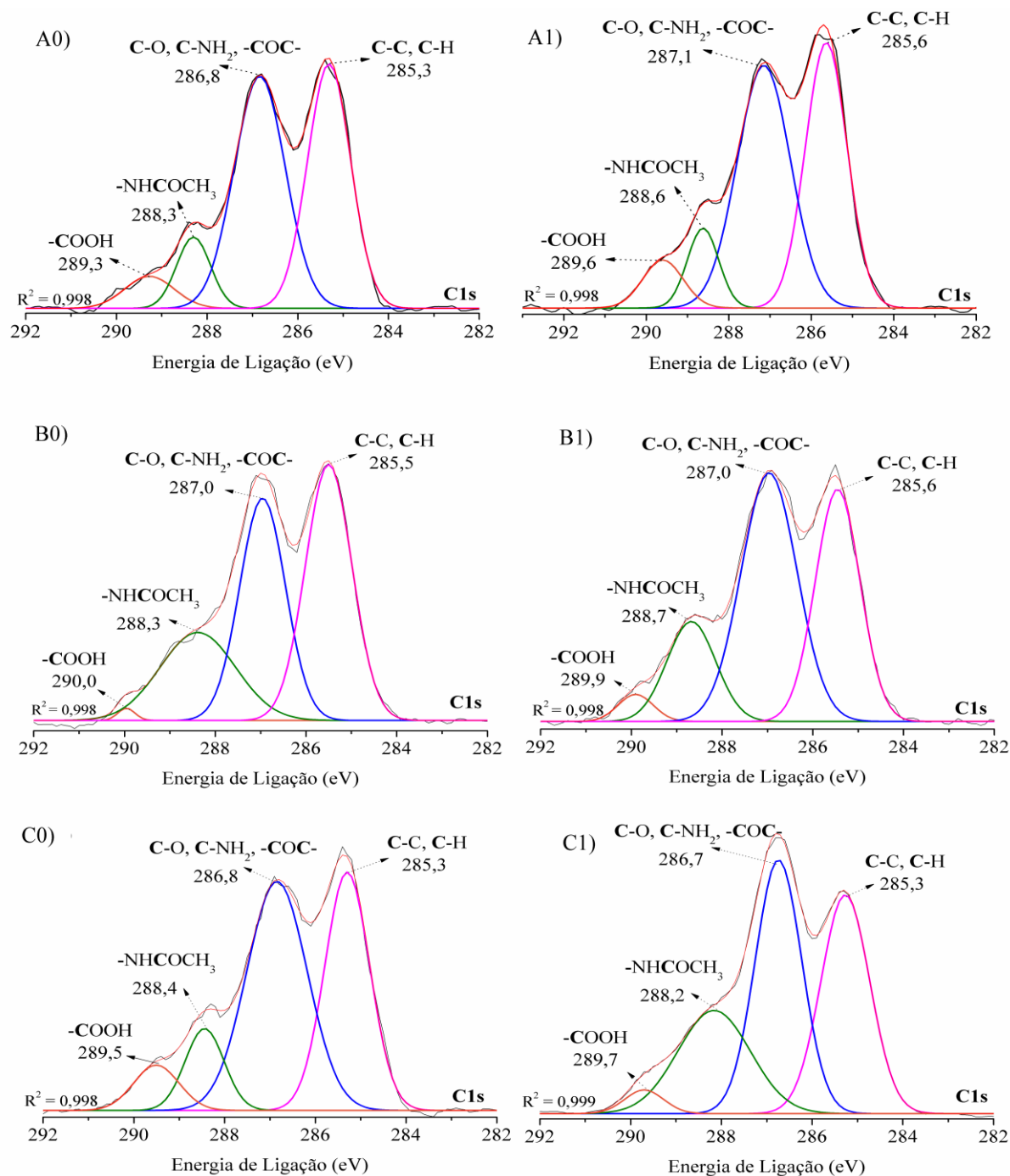
YAHIA, LH. History and Applications of Hydrogels. **Journal of Biomedical Sciences**, v. 04, n. 02, p. 1–23, 2015.

YULIZAR, Y. et al. Green Method for Synthesis of Gold Nanoparticles Using Polyscias scutellaria Leaf Extract under UV Light and Their Catalytic Activity to Reduce Methylene Blue. v. 2017, 2017.

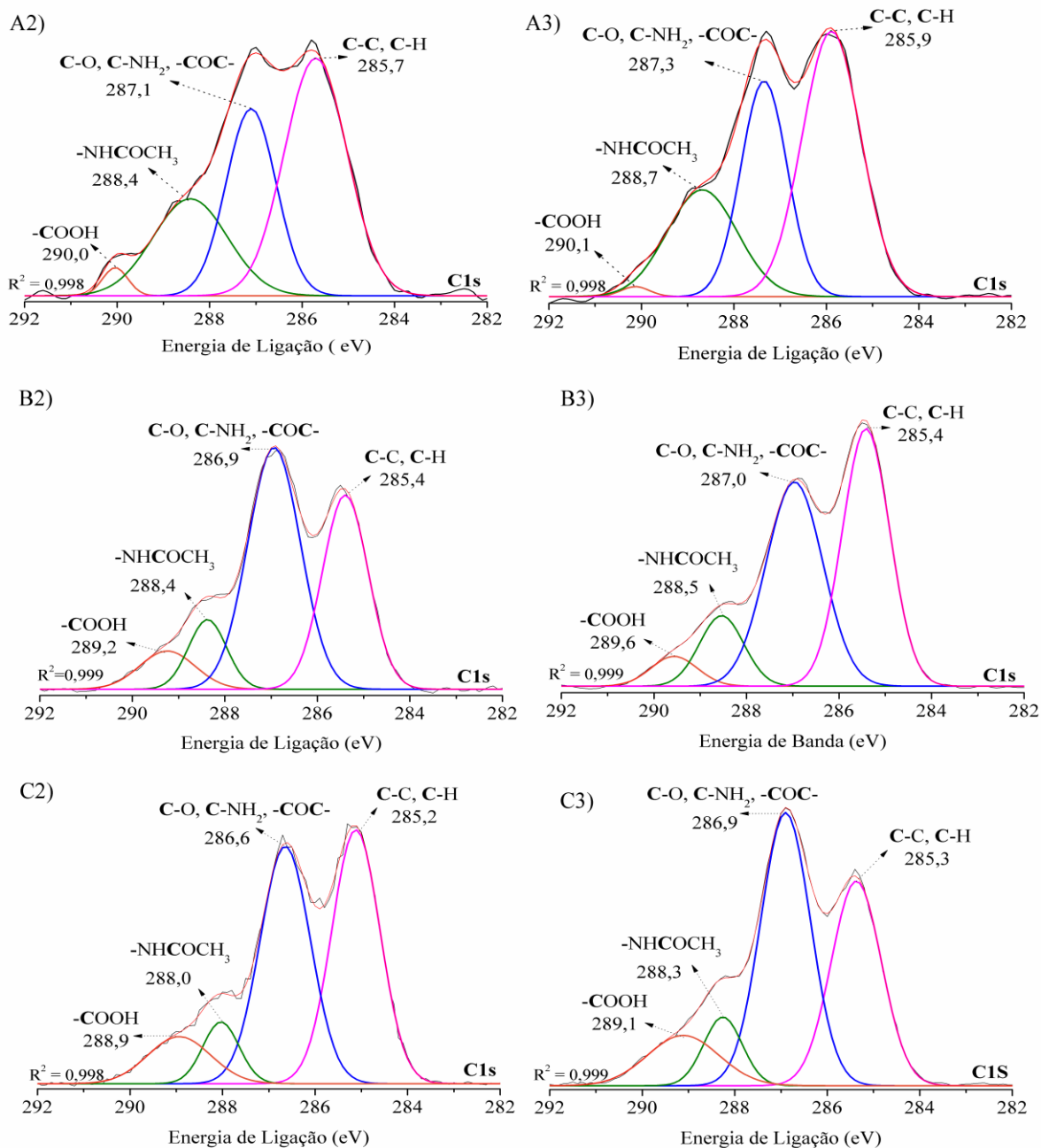
ZHANG, S. et al. **Hydrogels**. [s.l.] Springer Singapore, 2018.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1395–1410, 2012.

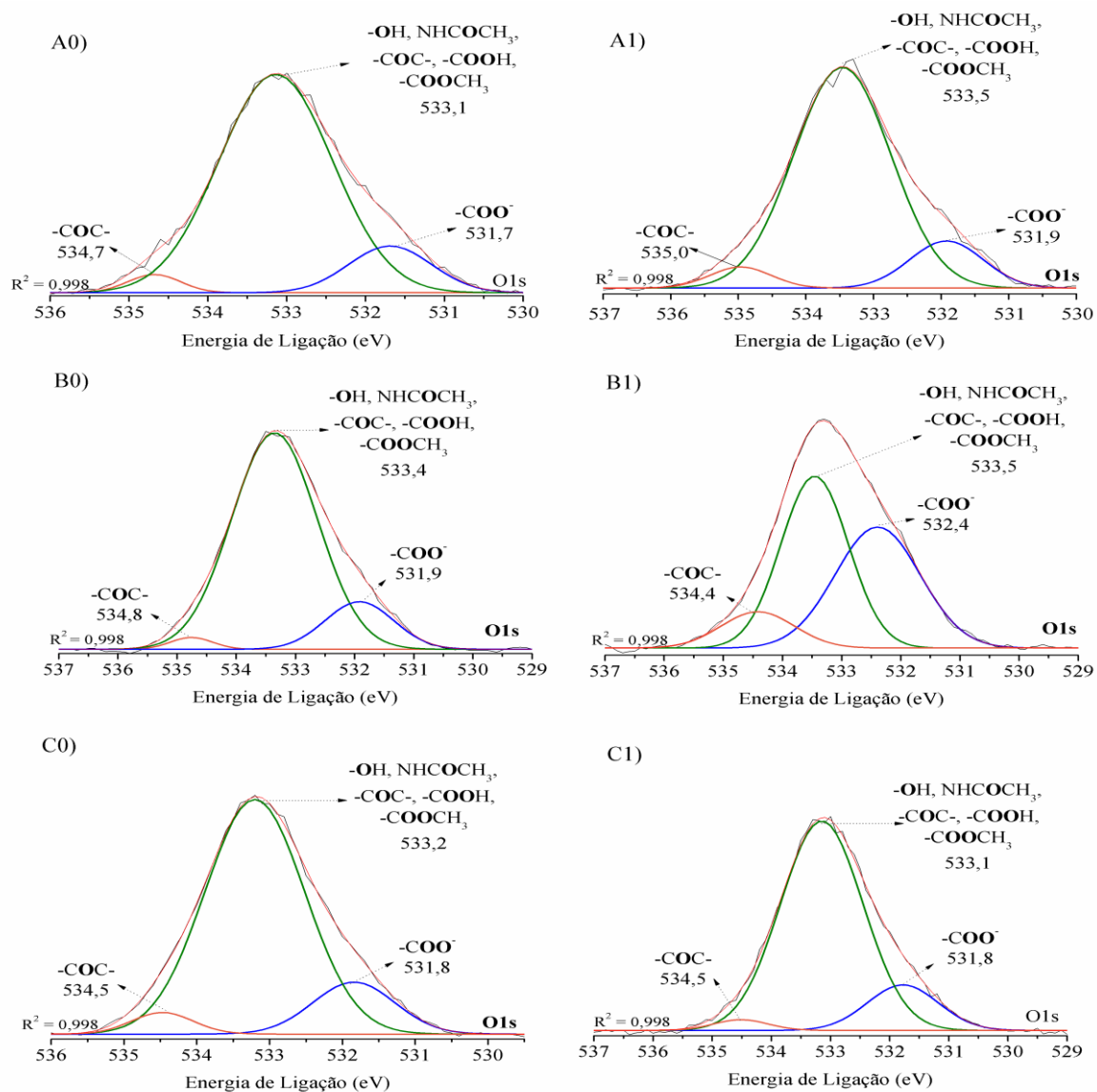
APÊNDICE A - Espectros XPS de alta resolução (C1s) dos compósitos obtidos contendo (A) 2,25% (m/v) e 1% (m/v) de quitosana, (B) compósitos contendo 2,5% (m/v) e 1% (m/v) de quitosana e (c) compósitos contendo 2,75% (m/v) e 1% (m/v) de quitosana. Em que a numeração situada na frente indica: (0) não há adição de HAuCl₄, (1) possui 1x10⁻⁴ mol.L⁻¹ HAuCl₄, (2) possui 2x10⁻⁴ mol.L⁻¹ HAuCl₄ e (3) possui 3x10⁻⁴ mol.L⁻¹ HAuCl₄.



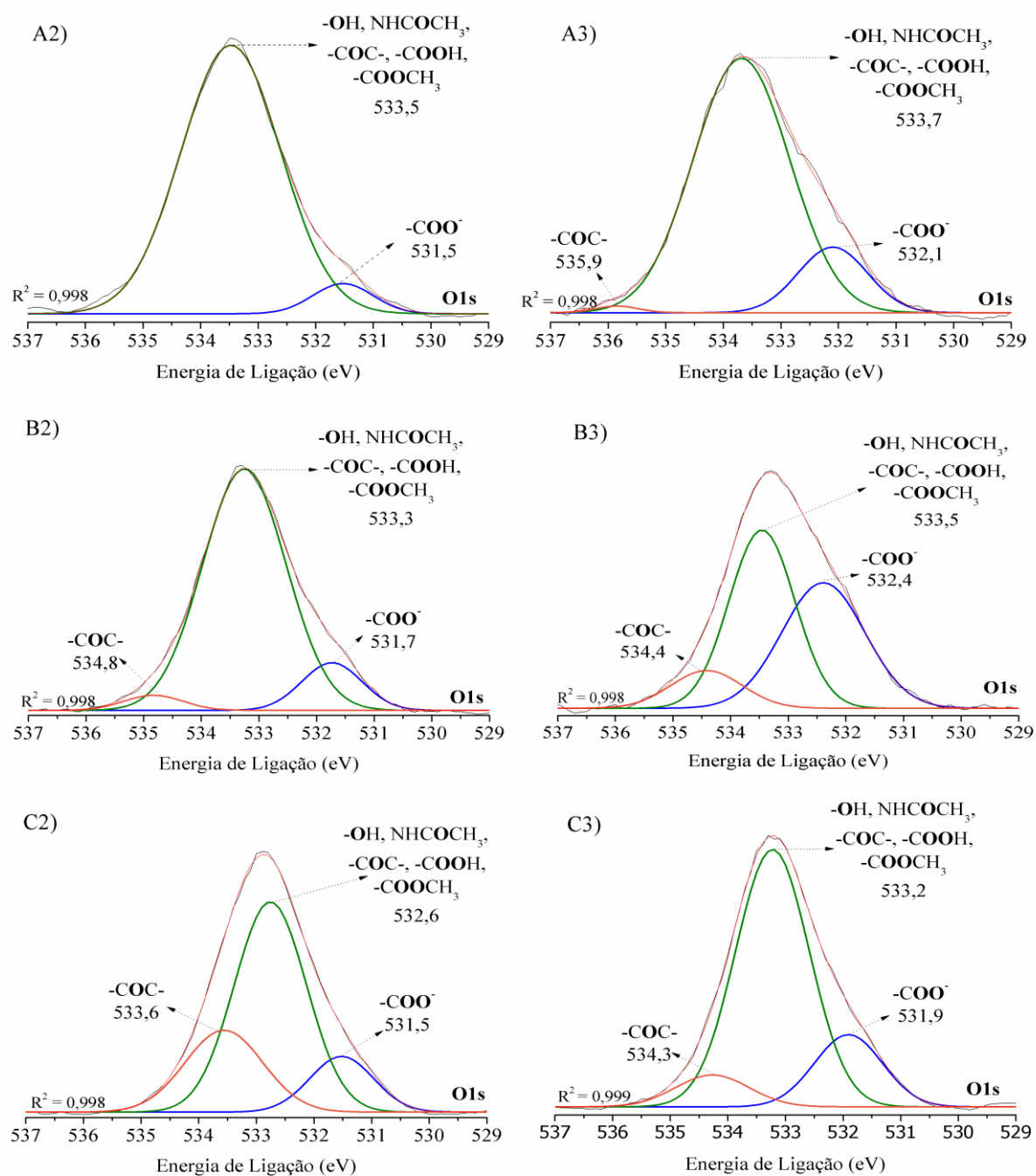
APÊNDICE A – CONTINUAÇÃO.



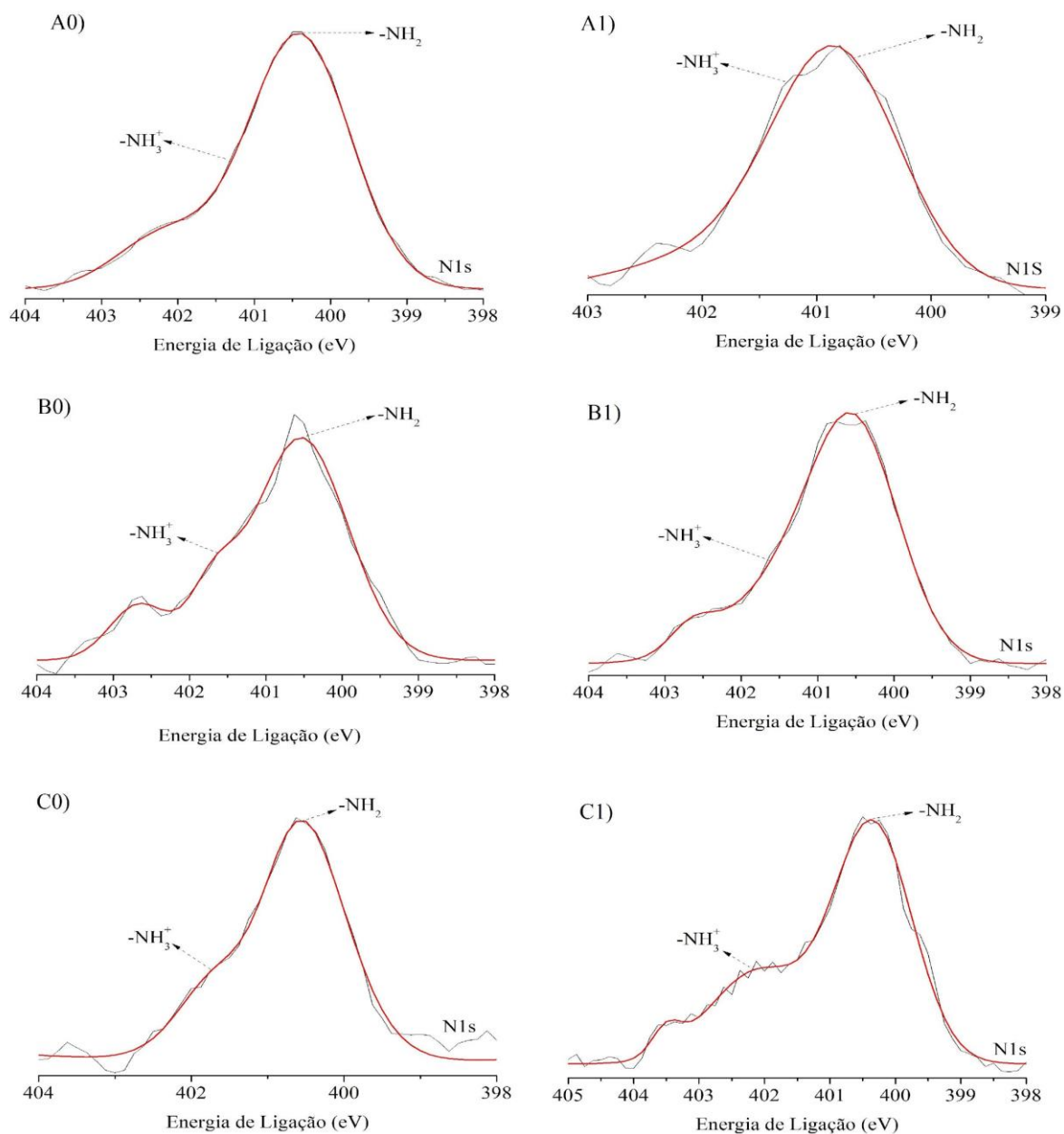
APÊNDICE B - Espectros XPS de alta resolução (O1s) dos compósitos obtidos: (A) compósitos contendo 2,25% (m/v) e 1% (m/v) de quitosana, (B) compósitos contendo 2,5% (m/v) e 1% (m/v) de quitosana e (c) compósitos contendo 2,75% (m/v) e 1% (m/v) de quitosana. Em que a numeração situada na frente indica: (0) não há adição de HAuCl_4 , (1) possui $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1} \text{HAuCl}_4$, (2) possui $2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1} \text{HAuCl}_4$ e (3) possui $3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1} \text{HAuCl}_4$.



APÊNDICE B – CONTINUAÇÃO



APÊNDICE C - Espectros XPS de alta resolução (N1s) dos compósitos obtidos: (A) compósitos contendo 2,25% (m/v) e 1% (m/v) de quitosana, (B) compósitos contendo 2,5% (m/v) e 1% (m/v) de quitosana e (c) compósitos contendo 2,75% (m/v) e 1% (m/v) de quitosana. Em que a numeração situada na frente indica: (0) não há adição de H₂AuCl₄, (1) possui 1×10^{-4} mol.L⁻¹ H₂AuCl₄, (2) possui 2×10^{-4} mol.L⁻¹ H₂AuCl₄ e (3) possui 3×10^{-4} mol.L⁻¹ H₂AuCl₄.



APÊNDICE C – CONTINUAÇÃO.

