Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia

PAULO ANTÔNIO GALINDO SOARES

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE HIDROGÉIS A BASE DE POLISSACARÍDEOS

Recife - PE
Agosto, 2015

PAULO ANTÔNIO GALINDO SOARES

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE HIDROGÉIS A BASE DE POLISSACARÍDEOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Área de Concentração em Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Profª. Drª. Maria das Graças Carneiro da Cunha (Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências/UFPE)

Recife - PE

Agosto, 2015

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Soares, Paulo Antonio Galindo

Obtenção, caracterização e aplicação de hidrogéis a base de polissacarídeos / Paulo Antônio Galindo Soares- Recife: O Autor, 2015.

48 folhas: il., fig., tab.
Orientadora: Maria das Graças Carneiro da Cunha
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2015.
Inclui referências e anexo

1. **Cicatrização de feridas 2. Polissacarídeos 3. Quitosana I. Cunha, Maria das Graças Carneiro da (orientadora) II. Título**

615.5 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2017-259

PAULO ANTÔNIO GALINDO SOARES

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE HIDROGÉIS A BASE DE POLISSACARÍDEOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Área de Concentração em Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: _21_/_08_/_2015_

COMISSÃO EXAMINADORA

____
Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Departamento de Bioquímica/LIKA - UFPE

____
Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Depatamento de Bioquímica - UFPE

____
Prof. Dr. Paulo Antônio de Souza Mourão
Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ

____
Profº Drº Wilson Barros Junior
Departamento de Física - UFPE

Aos meus queridos pais, Paulo Antônio Soares Sampaio e Maria Galindo Soares, aos meus irmãos Daniel e Mariana e à minha querida sobrinha Heloíse com todo o meu carinho.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a DEUS, por todas as horas e momentos de fraquejo, por toda proteção e cuidados que sempre tem me dado.

À Profª. Drª. Maria das Graças Carneiro da Cunha, pela confiança, amizade, carinho, paciência e orientação cientifica, pelo apoio no desenvolvimento e escrita de resumos para congressos, e principalmente no desenvolvimento desta tese. Enfim, agradeço pelos dez anos de jornada científica ao lado desta pessoa que me acolheu como um de seus filhotes.

Ao Profº. Drº. Wilson Barros Junior pelo apoio e colaboração no desenvolvimento de parte desta tese.

Ao Profº Drº Jacinto Costa e sua equipe pelo apoio e colaboração na etapa final desta tese.

Ao Profº. Drº. Paulo Mourão e ao Profº Drº Vitor Pomin por me acolherem em seus laboratórios, pelo apoio e colaboração, amizade e confiança que me foram dados.

A todos meus amigos do laboratório de Biotecnologia do departamento de Bioquímica da UFPE, em especial à Priscila, Marthyna e Isabel por todo apoio que me deram durante esta jornada.

Aos companheiros da Coordenação de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, do Laboratório de Glicoproteínas, Laboratório de Biologia Molecular e Laboratório de Enzimologia por todo apoio oferecido.

A toda a minha família pelo suporte, ajuda e compreensão que sempre me deram e me dão nas horas mais difíceis da minha vida.

À CAPES, FACEPE e CNPq pelo suporte financeiro.

Agradeço por tudo e a todos que me ajudaram de alguma forma nesta jornada.

"*A paciência serve de proteção contra injustiças como as roupas contra o frio. Se você veste mais roupas com o aumento do frio, este não terá nenhum poder para feri-lo. De forma idêntica você deve crescer em paciência quando se encontra em grandes dificuldades e elas serão impotentes para atormentar a sua mente*."

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

Hidrogéis são considerados uma rede polimérica tridimensional capaz de absorver grandes quantidades de água ou fluídos biológicos e que podem ser aplicados para a manutenção de células, nutrientes, drogas ou proteínas, bem como matriz de suporte para crescimento celular e regeneração de tecidos. Neste trabalho foram desenvolvidos hidrogéis baseados em polissacarídeos naturais, que foram caracterizados e aplicados como cicatrizantes de lesões cutâneas em ratos. Primeiro foi desenvolvido um hidrogel baseado nas misturas de policaju/quitosana nas proporções de 1:4 e 2:3 (p/p), cuja matriz foi formada seguindo ciclos de secagem/hidratação em valores de pH específicos. Para a caracterização destas formulações, foram empregadas técnicas de espalhamento dinâmico de luz, espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e reologia. Além disso, para o hidrogel de policaju/quitosana 1:4, foi avaliado o seu impacto na cicatrização de lesões cutâneas em ratos (Registro de Patente nº BR 10 2014 014009-3), cujos resultados demonstraram que este hidrogel contribuiu para um processo de cura e modulação da inflamação mais eficiente. Um Segundo hidrogel foi preparado com 1,7% (p/v) de galactomanana (extraída de sementes de *Cassia grandis*) e diferentes concentrações de κ-carragenana (0,3, 0,4 e 0,5% p/v), CaCl2 (0,0, 0,1 e 0,2 M) e pH (5,0, 5,5 e 6,0), utilizando um planejamento fatorial completo 2^3 baseado em parâmetros reológicos. A melhor formulação foi obtida com 1,7% (p/v) de galactomanana e 0,5% (p/v) de κ-carragenana, contendo 0,2 M de CaCl2 à pH 5,0. Ressonância magnética nuclear e microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas a fim de caracterizar esta formulação do hidrogel. Além disso, um estudo de prateleira foi conduzido ao longo de um período de 90 dias de estocagem a 4 ºC, avaliando pH, cor, contaminação microbiana e reologia. A capacidade cicatrizante deste hidrogel também foi avaliada como curativo tópico, e assim como para o hidrogel de policaju/quitosana, o hidrogel de galactomanana/κ-carragenana também contribuiu positivamente para o processo cicatricial; além disso, a incorporação de bromelina na matriz deste hidrogel estimulou e acelerou este processo. Em conclusão, os hidrogéis de policaju/quitosana e galactomanana/κ-carragenana podem ser uma via promissora no campo de biomateriais e aplicações biomédicas.

Palavras-chave: Bromelina. Caracterização de hidrogéis. Cicatrização. Galactomanana. κ-carragenana. Policaju. Quitosana.

ABSTRACT

Hydrogels are three-dimensional polymeric networks capable of absorbing large quantities of water or biological fluids and can be used to preserve cells, nutrients, drugs or proteins, as well as scaffold matrices for tissue engineering and healing process. In this work we have developed, characterized and applied as wound dressing, hydrogels based on natural polysaccharides. First we developed hydrogels based on mixtures of policaju/chitosan at weight ratios of 1:4 and 2:3 (p/p), which matrices were formed following rounds of drying/hydration cycles at a specific pH value. For the characterization of these formulations, dynamic light scattering, infrared spectroscopy, scanning electron microscopy and rheology techniques were employed. Futhermore, for the 1:4 policaju/chitosan hydrogel, was evaluated the impact of the hydrogel dressing at the wound healing of the cutaneous scars in rats (Patent register nº BR 10 2014 01409-3), which results demonstrated that this hydrogel contributed to more efficient healing process and modulation of the inflammation. A second hydrogel was prepared with 1.7 % (w/v) galactomannan (from *Cassia grandis* seeds) and different concentrations of κ-carrageenan (0.3, 0.4 and 0.5% w/v), CaCl2 (0.0, 0.1 and 0.2 M) and pH (5.0, 5.5 and 6.0), using a 2^3 full factorial design based on rheological parameters. The best formulation was obtained with 1.7% (w/v) galactomannan and 0.5% (w/v) κ-carrageenan, containing 0.2 M CaCl2 at pH 5.0. Nuclear magnetic resonance and scanning electron microscopy where used in order to characterize this hydrogel formulation. Further, a shelf life study was carried out with this formulation along 90 days-period of storage at 4 ºC, evaluating pH, color, microbial contamination and rheology. The wound healing capacity of this hydrogel was also evaluated as a topical dressing, and as was to the 1:4 policaju/chitosan hydrogel, the galactomannan/κ-carrageenan also contributed for the wound healing process; further, the incorporation of bromelain in the hydrogel matrix stimulating and accelerating this processes. In conclusion, the policaju/chitosan and galactomannan/κ-carrageenan hydrogels can be a promising road to biomaterials fabrication and biomedical applications.

Keywords: Bromelain. Chitosan. Cicatrization. Galactomannan. Hydrogels characterization. κ-carrageenan. Policaju.

LISTA DE FIGURAS

Artigo I

Registro de Patente

Artigo II

Artigo III

day of treatment. DAB and hematoxylin staining. CK14 immunoreactivity (asterisks) is apparent in the regenerated epithelium of HB at 7th day as well as the basal layers unwounded epithelium for all groups at 14th day. Tringles in H at 7th and 14th day show the areas of non-specific reaction for CK14. Scale bars: 100μm.

LISTA DE TABELAS

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS PRINCIPAIS

$\bar{\upsilon}$	- Frequência Vibracional em cm^{-1};
$\dot{\gamma}$	- Taxa de Cisalhamento;
A	- Área Exposta ao Cisalhamento;
A_A	- Taxa de Absorção de Água (%);
B_0	- Campo Magnético;
C	- Velocidade da Luz em cm/seg;
CHI	- Quitosana;
C_i	- Concentração Molar de $CaCl_2$;
CSF-1	- Fator de Estimulação de Colônias-1;
DD	- Grau de Deacetilação;
DLS	- Espalhamento Dinâmico de Luz;
EC	- Extrato Córneo;
əv	- Variação da Velocidade entre as Moléculas do Fluido;
$ə_y$	- Distância entre as Moléculas;
$ə_y/ə_t$	- Variação da Deformação em Função do tempo;
F	- Constante de Força de Ligação em dinas/cm;
F	- Força Necessária à Fluidez;
f(Ka)	- Função de Henry;
FTIR	- Espectrocopia de Infravermelho Transformada de Furier;
G	- α-Galactose;
G*	- Módulo de Cisalhamento Complexo;
G’	- Módulo de Armazenamento ou Elástico;
G’’	- Módulo de Perda ou Viscoso;
H	- Constante de Planck;
IPN	- Rede Polimérica Interpenetrante;
K	- Constante de Boltzmann;
K1	- 3,6-Anidro-α-Galactose;
K4	- β-Galactose-4-Sulfatada;
M	- β-Manose;

MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura;
M_x e M_y	- Massas dos Átomos X e Y em Gramas;
PDGF	- Fator de Crescimento Celular Derivado de Plaquetas;
PDI	- Índice de Polidispersividade;
POLI	- Policaju;
PPM	- Partes por Milhão
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear;
RVL	- Região Viscoelástica Linear;
Semi-IPN	- Rede Polimérica Semi-Interpenetrante;
T	- Temperatura em Kelvin;
Tanδ	- Razão entre os módulos G' e G'';
TGF-β	- Fator de Crescimento Transformante β;
T_t	- Temperatura de transição de fase;
EU	- Mobilidade Eletroforética;
W_D	- Peso do Material Seco;
W_W	- Peso do Material Inchado;
ΔE	- Diferença de Energia entre Dois Estados Quantizados;
ω_0	- Frequencia do Campo Magnético
ε	- Constante Dielétrica;
γ	- Proporção Giromagnética
η	- Viscosidade;
η^*	- Viscosidade complexa;
κC	- Concentração de κ-Carragenana;
τ	- Tensão de Cisalhamento;
ζ	- Potencial Zeta;
ν	- Freqüência do Número de Oscilações Eletromagnéticas na Distância em que a Luz Viaja em um Segundo;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

Transformar pesquisa acadêmica em processos e produtos comercializáveis sempre é um desafio para empresários e Universidades. Criar um produto que seja competitivo com os similares importados é um obstáculo adicional. Segundo dados do Ministério da Saúde (2013), o setor de Biotecnologia oferece grande potencial de desenvolvimento em várias áreas. Na área de saúde humana, foram investidos em 2013 cerca de R$ 9,4 bilhões. O setor de produção de curativos, materiais aplicados diretamente sobre feridas, vem registrando uma velocidade de crescimento surpreendente e a previsão é que já movimente algo em torno de R$ 150 a 200 milhões por ano no Brasil. Com as boas perspectivas nesse segmento, a fabricação de produtos inovadores e de valor semelhante aos já comercializados serão futuramente aplicados como novas tecnologias.

Muitos produtos sintéticos comercializáveis contêm agentes ativos, componentes com atividades específicas responsáveis pela ação desejada, além de outros compostos com ação não específica que atuam como excipientes na formulação. Estes agentes ativos muitas vezes são compostos instáveis, podendo reagir com outros componentes da formulação, ou ainda provocarem irritações quando aplicados diretamente na pele ou tecido.

Entre o grande número de compostos bioativos naturais não-tóxicos que apresentam uma grande aplicação biotecnológica está a bromelina, um conjunto de proteases presentes no caule, talo, casca e polpa do abacaxi (*Ananas comosus*). Estas enzimas apresentam diversas aplicações na área médica, todas baseadas em sua atividade proteolítica (WU et al., 2012; CHOBOTOVA, VERNALLIS & MAJID, 2010), uma vez que são capazes de participar de vários processos fisiológicos, incluindo a morfogênese tecidual, reparação tecidual, angiogênese e remodelação do tecido, reduzindo hematoma, inchaço, dor e tempo de cicatrização (ROSENBERG et al., 2012; RAHM & LABOVITZ, 2007). Contudo, o problema em utilizar tais enzimas pode se dar pela sua instabilidade, pois tratando-se de proteínas, estão sujeitas a inativação e/ou desnaturação dependendo da forma e do meio onde são aplicadas.

Neste contexto, os hidrogéis, uma rede polimérica tridimensional capaz de absorver grande quantidade de água ou fluído biológico têm sido amplamente utilizados para conservar células, nutrientes, drogas ou proteínas (LEFNAOUI &

MOULAI-MOSTEFA, 2014; LIU et al., 2014b; DA-LOZZO et al., 2013). Os hidrogéis são obtidos a partir de polímeros hidrofílicos (naturais ou sintéticos) e apresentam um grande potencial de aplicação em diversas áreas da biotecnologia (WANG et al., 2014; ELLURU et al., 2013), contudo poucos estudos são reportados com relação ao desenvolvimento de novos hidrogéis à base de polissacarídeos naturais sem que haja modificações em sua estrutura química.

Entre os exemplos de polissacarídeos naturais podemos citar: 1) O polissacarídeo extraído da goma do cajueiro *Anacardium occidentale* L. (Policaju), um arabinogalactano capaz de formar hidrogéis e que apresenta potencial de aplicação na cicatrização de lesões cutâneas (SOARES et al., 2014; MONTEIRO et al., 2007; SCHIRATO et al*.,* 2006); 2) As carragenanas, que são extraídas de algas vermelhas da classe *Rhodophyceae*, em especial a κ-carragenana, que tem sido utilizada como espessante, gelificante e estabilizante na indústria alimentícia e farmacêutica, bem como na redução e/ou eliminação da toxicidade em aplicações biomédicas (LEFNAOUI & MOULAI-MOSTEFA, 2014; HEZAVEH & MUHAMAD, 2013; SALGUEIRO et al., 2013); 3) A quitosana, obtida pela desacetilação alcalina da quitina, que possui uma excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, propriedades curativas e hemostáticas, bem como atividade antimicrobiana (ZANG et al., 2014; MIGUEL et al., 2014; MADHUMATHI et al., 2009); e 4) As galactomananas extraídas do endosperma de sementes de leguminosas, que apresentam propriedades particulares como massa molar elevada, solubilidade em água e caráter não iônico (POLLARD et al., 2010; GILDLEY & REID, 2006), além da grande capacidade de moldar filmes/membranas (CERQUEIRA et al., 2011; CERQUEIRA et al., 2009) e atuar como agente gelificante (ALBUQUERQUE et al., 2014; PEREIRA-NETTO et al., 2012; PINHEIRO et al., 2011).

Dentro deste contexto, visando o aproveitamento de matérias primas naturais, o presente trabalho visou o desenvolvimento de novos hidrogéis à base de polissacarídeos, com ou sem bromelina incorporada, a caracterização dos mesmos e sua aplicação na área biomédica como agentes cicatrizantes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obter, caracterizar e aplicar como curativo tópico novos hidrogéis preparados à base de polissacarídeos com ou sem bromelina incorporada.

2.2 Objetivos Específicos

a) Extrair o polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.);
b) Obter hidrogéis à base dos polissacarídeos da goma do cajueiro e quitosana;
c) Extrair a galactomanana das sementes de *Cassia grandis*;
d) Obter hidrogéis à base dos polissacarídeos galactomanana e κ-carragenana;
e) Avaliar as características físico-químicas dos hidrogéis obtidos através do tamanho de partículas (DLS), potencial zeta, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho transformada de Furrier (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), reologia, absorção de Água (A.A.%);
f) Imobilizar bromelina à matriz do hidrogel galactomanana/ κ-carragenana;
g) Avaliar a atividade cicatrizante dos hidrogéis obtidos em lesões cutâneas (ensaios *in vivo*).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BIOMATERIAIS

Um biomaterial é definido como toda substância (exceto fármacos), ou combinação de substâncias, natural ou sintética, que pode ser utilizada por qualquer período de tempo, visando tratar, reparar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo, implantados a este temporariamente ou permanentemente (CHEN & THOUAS, 2015).

Historicamente, os biomateriais desenvolveram-se a partir de uma combinação satisfatória de propriedades físico-químicas próximas àquelas do tecido substituído, contando que apresentassem uma resposta tóxica mínima para o hospedeiro. Olhos, orelhas, dentes e narizes artificiais foram encontrados em civilizações pré-históricas. Chineses e indianos usavam ceras, colas e tecidos na reconstrução de partes perdidas ou defeituosas do corpo (RATNER et al., 2013).

Hoje, os biomateriais são utilizados largamente na área biomédica, principalmente na forma de implantes ou dispositivos médicos (suturas, placas para reforço ou revestimento de ossos, substituição de articulações, implantes dentários, marca-passos, biossensores, etc.) com a finalidade de substituir e/ou restaurar a função de organismos, tecidos traumatizados ou degenerados, corrigindo e melhorando a qualidade de vida dos pacientes (CHEN & THOUAS, 2015).

O mercado mundial de biomateriais está estimado para chegar a 88,4 bilhões de dólares em 2017 a partir de 44,0 bilhões de dólares calculados em 2012, crescendo a uma taxa anual média de 15%. O aumento dos investimentos, financiamento e subsídios por órgãos governamentais em todo o mundo, o aumento incessante do número de colaborações, conferências e atividades relacionadas com a pesquisa, os avanços tecnológicos, cada vez mais aplicações de biomateriais, e o crescente número de idosos são os principais fatores que impulsionam o crescimento dos biomateriais no mercado mundial. As reações imunológicas e inflamatórias, sistemas regulatórios rigorosos, fadiga, fratura, desgaste e preocupações com reembolso são os principais impedimentos para conter o mercado dos biomateriais (BIOMATERIALS MARKET, Em: http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biomaterials-393.html. Acessado em: 20/11/2014). Portanto, uma boa caracterização das propriedades físico-químicas do biomaterial é previamente necessária para avaliar se o mesmo é apto a ser aplicado.

Assim, o critério de seleção de um biomaterial começa avaliando-se as propriedades requeridas para a aplicação em questão. As propriedades físicas, químicas e mecânicas devem ser avaliadas na escolha dos materiais, tais como fadiga, resistência, taxa de permeação a gases, rugosidade, bioatividade, biocompatibilidade, entre outras. Além disso, tais propriedades são extremamente sensíveis às variações na estrutura do material, quer seja na escala micro ou nanométrica, é fundamental que se conheça as relações entre a microestrutura e as propriedades desejadas (RATNER et al., 2013). Deve ser mencionado ainda que o prefixo "bio" de biomateriais refere-se à "biocompatível", ao invés de "biológico" ou "biomédico", como é muitas vezes confundido.

A biocompatibilidade é condição indispensável para o emprego de um material como biomaterial. Trata-se da habilidade de desempenhar uma função com uma resposta tecidual e biológica apropriada dentro da aplicação específica a que se destina. Isto significa que estes materiais não devem desencadear reações desfavoráveis, imprevisíveis ou incontroláveis nos sistemas biológicos, ou seja, devem ser atóxicos, não carcinogênicos, não alergênico, não mutagênicos e não trombogênicos (CHEN & THOUAS, 2015).

Quanto aos diferentes tipos de materiais com os quais são desenvolvidos, os biomateriais podem ser metálicos, cerâmicos, poliméricos (naturais ou sintéticos) ou compósitos (WONG & BRONZINO, 2007). Alguns desses biomateriais com as respectivas funções e composições são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Exemplos de metais, cerâmicas, polímeros e compósitos na produção de biomateriais.

Metal		
Material	**Biomaterial (Aplicação)**	**Referência**
Aço inox (316 L); Ligas Cr-Co-Mo; Ligas Ni-Cr, Au-Pd, Ag-Pd; Ti.	Próteses ortopédicas; implantes dentais; parafusos; placas e pinos (fixação de fraturas); válvulas cardíacas.	CHEN & THOUAS, 2015; LATIFI et al., 2014; LUO & LI, 2014; YAVARI et al., 2014.
NiTi.	Fios ortodônticos; "*stents*" vasculares; limas endodônticas.	TOFAIL et al., 2014; YANG et al., 2014a.
Cerâmica		
Material	**Biomaterial (Aplicação)**	**Referência**
Alumina (Al_2O_3); Zircônia (ZrO_2).	Próteses ortopédicas e dentárias; enxerto ósseo (suporte para crescimento de tecido em próteses cardiovasculares, ortopédicas e bucomaxilofaciais).	SOH, KOLOS & RUYS, 2015; LÓPEZ-LÓPEZ, MORENO & BAUDÍN, 2015; KURTZ et al., 2014.
Hidroxiapatita [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$].	Reparo ósseo; Implantes nasais e auriculares (Reconstrução maxilofacial); obliteração de bolsas periodontais.	KATTI et al., 2015; COX et al., 2015.
Tricálcio-fosfato [$Ca_3(PO_4)_2$].	Preenchimento temporário do espaço ósseo (cimento ósseo).	ALSHEMARY et al., 2015; GARCÍA-PÁEZ et al., 2014.

Cont... Tabela 1.

Polímeros		
Material	**Biomaterial (Aplicação)**	**Referência**
Polietileno(glicol); poli(cloreto de vinila); poliéster; borracha de silicone; poli(tereftalato de etileno); politetrafluoretileno.	Implantes cardiovasculares; Carreadores de fármacos (suporte para a imobilização de biomoléculas).	XU et al., 2015; ULBRICHT, JORDAN & LUXENHOFER, 2014; MORRIS & KYRIAKIDES, 2014; TU et al., 2013.
Polipropileno; Seda; Náilon.	Nanofibras; Suturas (manutenção de contato entre tecidos para auxiliar na cura).	DINIS et al., 2015; WOLF et al., 2014; ABDAL-HAY et al., 2014.
Colágeno tratado.	Pele artificial.	KUNERT-KEIL et al., 2015; CHEN et al., 2015.
Compósito		
Material	**Biomaterial (Aplicação)**	**Referência**
Compósito polissulfona-fibra de carbono; compósito de ácido polilático-ácido poliglicólico.	Pinos intramedulares (alinhamento de fraturas).	STANKOVA et al., 2014; ABDULKHANI et al., 2014; LU et al., 2013.
Compósito de espuma de policaprolactona (PCL) – filme de PCL.	Pele artificial.	JI et al., 2015; JANG et al., 2014a.

FONTE: PRÓPRIO AUTOR (2015).

Quanto aos materiais poliméricos, os biopolímeros, macromoléculas derivadas de seres vivos, estão entre os mais utilizados em aplicações biomédicas, destacando-se o algodão e a seda na produção de membranas para o suporte de biomoléculas, fios de sutura, etc. (MODJARRAD & EBNESAJJAD, 2014). Os biopolímeros também têm sido aplicados no desenvolvimento de géis, um biomaterial com ampla aplicação não só na área biomédica, como também na alimentícia, cosmética e farmacêutica (BUWALDA et al., 2014).

3.1.1 Géis

Géis são biomateriais de natureza intermediária entre líquidos e sólidos, definidos como uma rede polimérica entrecruzada intumescida em um meio líquido (NIAOUNAKIS, 2015; OSADA et al., 2001). De maneira geral, nos géis as cadeias poliméricas estão conectadas entre si formando uma rede entrelaçada, o que confere rigidez a estrutura, sendo a fase contínua, ou dispersante (líquido), mantida dentro de malhas e a fase dispersa (polímeros) encontra-se frequentemente presente em pequena quantidade (OSADA et al., 2001).

Os géis apresentam propriedades mecânicas de um sólido, ou seja, eles podem se auto sustentar e manter suas formas sob esforço mecânico. Em outras palavras, apresentam “resiliência”, isto é, possuem a capacidade de absorver energia quando deformados elasticamente por uma força tensionante e liberá-la quando descarregado, recuperando completamente suas dimensões originais após a retirada da tensão (HAN, 2007).

Há muitas maneiras de se obter um gel. Para tal, toda solução polimérica passará pelo processo de gelificação. Em geral, é o processo de transição de solução de alta massa molar para gel, ocasionado pelas interações entre as cadeias poliméricas ou sistema coloidal, perdendo assim sua habilidade de fluxo. Essa transição ocorre pela ação de um agente reticulador químico no caso de géis quimicamente reticulados, ou alterações físicas, tais como pH, temperatura ou concentração do polímero, por exemplo, para o caso de géis fisicamente reticulados (OSADA et al., 2001).

Provavelmente, o gel mais conhecido seja a “gelatina”, onde a rede é feita de polímeros de derivados proteicos (colágeno), na qual apenas 3% do volume correspondem ao polímero, enquanto o restante corresponde à porção líquida

(GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011). Entre outros exemplos de géis está o fluido aquoso contido entre a córnea e o cristalino que preenche o interior do olho, o revestimento das células epiteliais do estômago e o fluido sinovial que lubrifica as juntas do esqueleto (SMITH et al., 2014; LAI et al., 2009; HOLEKAMP, 2010). Em tais géis biológicos, o componente líquido permite a livre difusão de gases e nutrientes e a rede polimérica é a matriz estrutural que mantém o líquido aprisionado.

Além dos géis biológicos citados acima, existem outros tipos de géis orgânicos e inorgânicos sintetizados pelo homem. Levando-se em conta a natureza do solvente e fase coloidal, o número de fases, a afinidade entre as fases e a natureza das ligações entre as cadeias poliméricas, os géis podem ser classificados de diferentes maneiras (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação e aplicação dos géis quanto à natureza da fase líquida e fase coloidal, o número de fases, a afinidade entre as fases e a natureza das ligações entre as cadeias poliméricas.

Critério de classificação	**Tipo de Gel**	**Descrição**	**Exemplos**	**Referências**
Natureza do solvente	Hidrogel	Substância hidrofílica	Gel de sílica; metilcelulose.	KIM et al., 2014; GRIFfiN et al., 2014.
	Óleo-Gel	Substância hidrofóbica	Óleo de insetos; ethycellulose.	GRAVELLE et al., 2014; PATEL et al., 2013.
	Aerogel; Xerogel	Ar	Sensor de gases.	HARLEY-TROCHIMCZYK et al., 2015; LIU et al., 2014a.
Natureza da fase coloidal	Orgânico	Monofásico	Carbopol®.	JANA et al., 2014.
	Inorgânico	Bifásico*	SiO_2, TiO_2, PbO.	CHAN et al., 2014.
Afinidade entre as duas fases	Liófilo	Grande afinidade	Gelatina.	GAOWA et al., 2014.
	Liófobo	Pouca afinidade	Sílica-Gelatina.	SMITHA et al., 2007.
Natureza das ligações entre as cadeias poliméricas	Químico	Ligações covalentes	Copolímero divinil-benzeno-estireno.	MOURA et al., 2013.
	Físico	Ligações iônicas; Pontes de hidrogênio; Interações hidrofóbicas; Forças de Van der Waals	Gel de Alginato; Policaju-Quitosana.	SOARES et al., 2014; GENTILE, GRECO & LAROBINA, 2013.

*geralmente; FONTE: PRÓPRIO AUTOR (2015).

Dos tipos de géis apresentados na tabela 2, os hidrogéis estão entre os mais empregados industrialmente, pois apresentam boas propriedades mecânicas que lhes garantem fácil espalhamento e remoção, e que devido a sua natureza hidrofílica, podem veicular princípios ativos hidrossolúveis e lipossolúveis (em associação com agentes dispersantes) (AHMED, 2013).

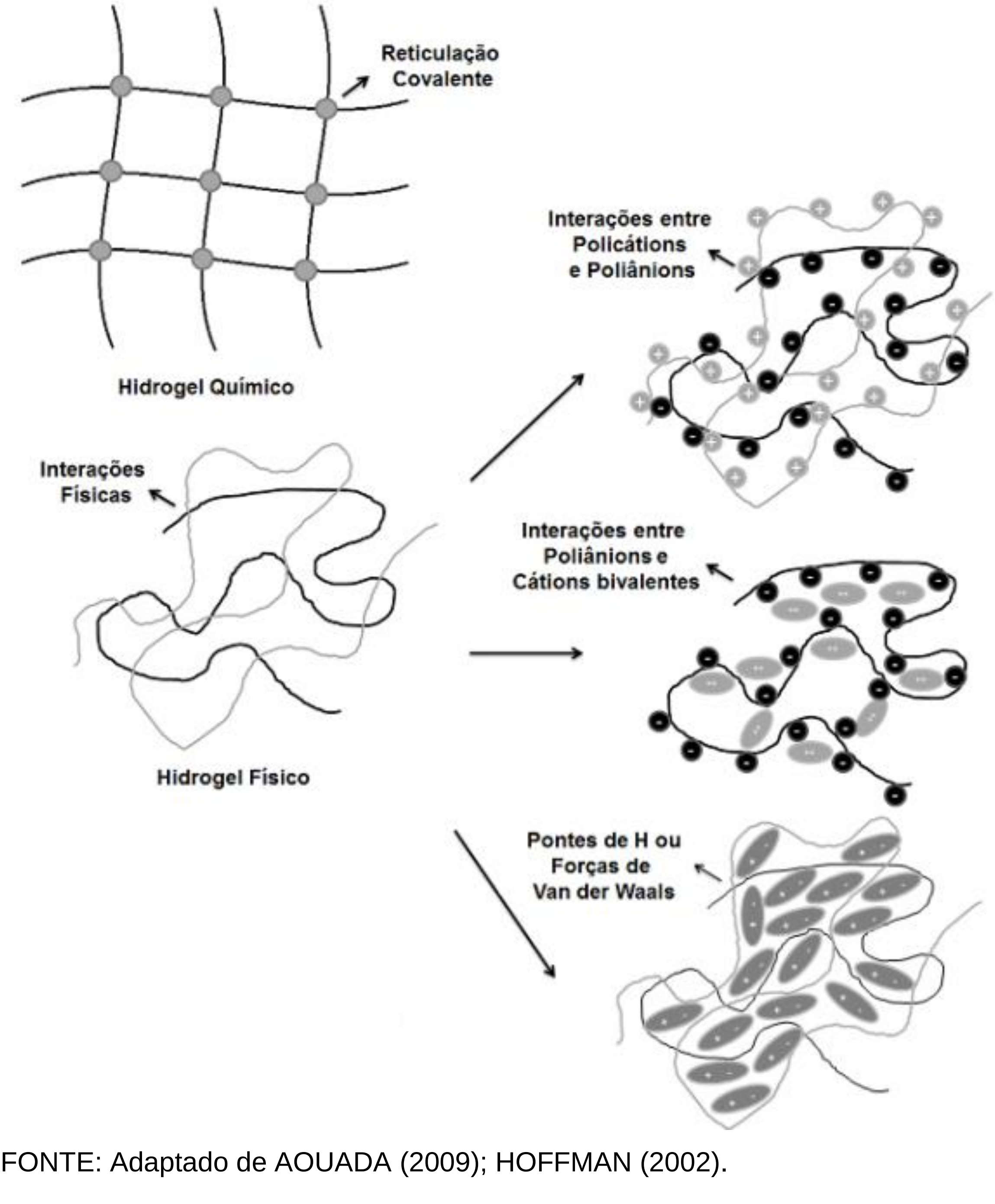
3.1.2 Hidrogéis

Os hidrogéis são definidos como uma rede polimérica tridimensional capaz de absorver grande quantidade de água ou fluído biológico. Quimicamente, os hidrogéis são baseados em polímeros hidrofílicos, que são intercruzados para prevenir a sua dissolução em água, podendo assim ser utilizados para conservar células, nutrientes, drogas ou proteínas. Em um ambiente aquoso, os grupos hidrofílicos da rede polimérica são hidratados e geram a estrutura em "rede" do hidrogel. O termo "rede" implica intercruzamento químico ou físico entre os grupamentos ativos dos polímeros em composição. Além disso, os hidrogéis podem ser formulados em uma variedade de formas físicas, incluindo desde placas a micro e nanopartículas, até revestimentos e filmes edíveis (LEFNAOUI & MOULAI-MOSTEFA, 2014; LIU et al., 2014b; DA-LOZZO et al., 2013).

Geralmente, as soluções aquosas de polímeros hidrofílicos em concentrações baixas ou moderadas são completamente fluidas. Por outro lado, uma vez que ligações cruzadas entre as diferentes cadeias de polímeros são introduzidas, as "redes" assim obtidas transformam-se completamente adquirindo natureza viscoelástica e, por vezes, completamente sólida (HENNINK & VAN NOSTRUM, 2002; CUGGINO et al., 2008).

Dependendo do tipo de ligação existente entre as cadeias poliméricas que formam a matriz dos hidrogéis, estes, assim como os demais tipos de géis, podem ser também classificados em hidrogéis físicos ou químicos. Nos hidrogéis físicos (Figura 1), também chamados de “pseudogéis”, as cadeias poliméricas estão unidas por interações não covalentes, que podem ser facilmente desfeitas através de mudanças na temperatura e pH, por exemplo. Dentre estas interações, podemos destacar as forças eletrostáticas, as ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e enovelamento das cadeias poliméricas (AHMED, 2013). Já nos hidrogéis químicos ou permanentes (Figura 1), a estrutura tridimensional é coesa graças a ligações covalentes entre as cadeias poliméricas, e que não são facilmente desfeitas com aquecimento ou adição de solventes, mas podem ser degradadas por reações químicas e quebradas sob estresse mecânico (AHMED, 2013).

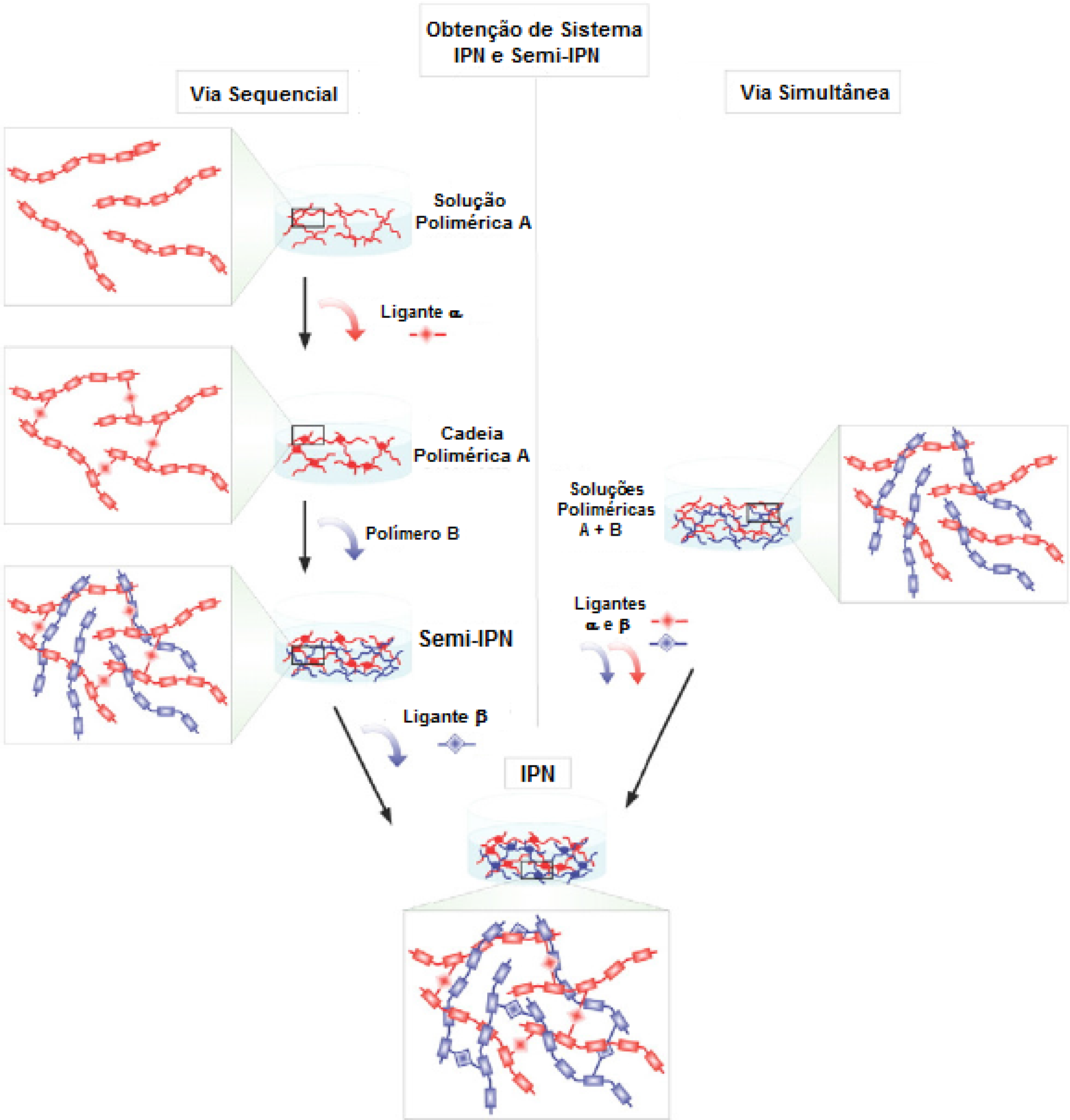
Figura 1 - Estruturas representativas de hidrogéis químicos e físicos.



FONTE: Adaptado de AOUADA (2009); HOFFMAN (2002).

Ainda no que diz respeito à classificação dos hidrogéis, estes ainda podem ser classificados em uma rede polimérica interpenetrante (IPN) ou uma rede polímerica semi-interpenetrante (semi-IPN) (Figura 2).

Figura 2 **-** Representação esquemática da formação de um sistema semi-IPN e IPN. Os polímeros A e B são polímeros genéricos (lineares ou ramificados). α e β são ligantes genéricos químicos ou físicos.



FONTE: MATRICARDI et al. (2013).

Segundo a IUPAC, “um hidrogel IPN corresponde à interação entre polímeros com duas ou mais cadeias poliméricas as quais estão pelo menos parcialmente intrelaçadas numa escala molecular, mas não covalentemente ligadas entre si e que não podem ser separadas a menos que as ligações químicas sejam quebradas. Uma mistura entre duas ou mais cadeias poliméricas pré-formadas, não é um sistema IPN". Por outro lado, "um hidrogel semi-IPN correponde à interação entre polímeros com uma ou mais cadeias poliméricas lineares ou ramificadas caracterizadas pela penetração numa escala molecular de pelo menos uma das cadeias por pelo menos uma das macromoléculas lineares ou ramificadas" (JERKINS et al., 1996).

Devido à sua capacidade de absorção de água, os hidrogéis não são apenas objeto de investigação de pesquisadores interessados em aspectos fundamentais no que diz respeito ao inchamento das redes poliméricas, mas também possuem ampla aplicação em diferentes áreas biotecnológicas, por exemplo, como materiais para lentes de contato e separação de biomoléculas ou células, matrizes para a imobilização de células, como dispositivos para a liberação controlada de compostos bioativos (LIM, TEY & CHAN, 2014), em práticas clínicas da medicina experimental para a engenharia e regeneração de tecidos (MIGUEL et al., 2014; HU et al., 2012), diagnósticos, além de servirem de materiais de barreira para regular aderências biológicas a exemplo das lentes de contato (WANG et al., 2010).

Os hidrogéis também são biocompatíveis, sendo a biocompatibilidade promovida pelo seu alto teor de água e as semelhanças físico-químicas que possuem com a matriz extracelular nativa de tecidos orgânicos, tanto de composição (sobretudo no caso de hidrogéis a base de carboidratos) quanto mecanicamente (WANG et al., 2014; ELLURU et al., 2013). A biodegradabilidade da matriz polimérica pode ser projetada através de via enzimática, além de vias hidrolítica ou ambiental (por exemplo, pH, temperatura ou campo elétrico), no entanto, a degradação nem sempre é desejável, dependendo do tempo de liberação e local de entrega da biomolécula (LIM, TEY & CHAN, 2014). Além disso, hidrogéis são relativamente deformáveis e podem se adaptar à forma da superfície a qual eles são aplicados. Neste último contexto, as propriedades de muco ou bioadesividade de alguns hidrogéis pode ser vantajosa para imobilizá-los no local da aplicação, mesmo que a superfície tópica não seja horizontal (HOARE & KOHANE, 2008).

3.2 TÉCNICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS

Para inclusão no mercado como um novo biomaterial, os hidrogéis devem ser cuidadosamente caracterizados. A utilização de técnicas que permitem avaliar seu comportamento mecânico, grau de intumescimento, a estrutura da matriz e tipo de interação entre as cadeias poliméricas (reologia, absorção de água, microscopia eletrônica de varredura, ressonância magnética nuclear e espectroscopia na região do infravermelho), além de suas propriedades biológicas (especificidade de tecidos, atividade celular e biocompatibilidade), são importantes para determinar em qual área da indústria o hidrogel poderá ser aplicado (HAN, 2007; AHMED, 2013).

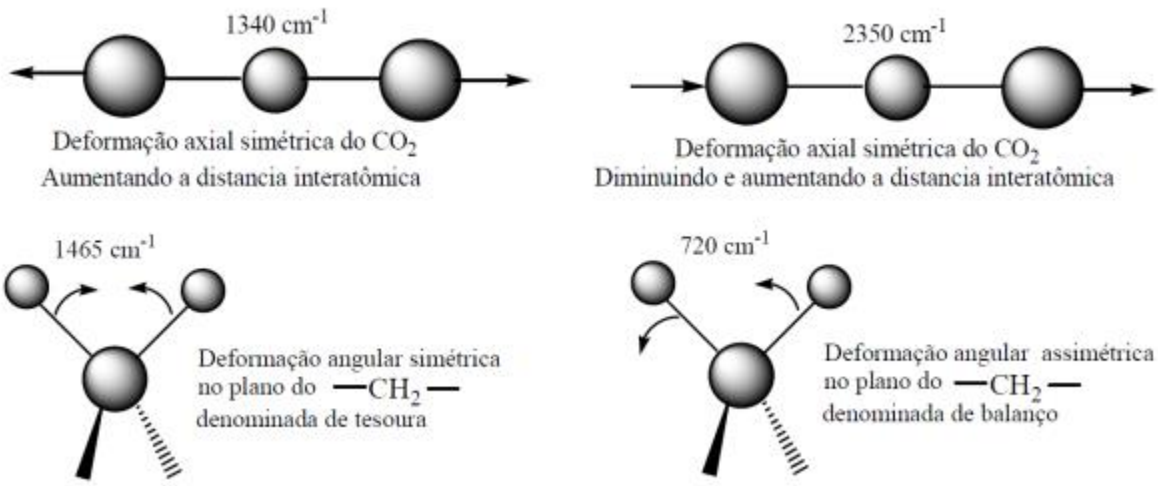
3.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho transformada de Fourier (FITR)

Um dos maiores problemas fundamentais na avaliação da estrutura de géis poliméricos é a análise estrutural a nível molecular, em particular, a determinação da conformação molecular e análise quantitativa. Vários hidrogéis físicos obtidos a partir de soluções poliméricas semicristalinas são conhecidos por formarem redes poliméricas com alto grau de organização. Além disso, na organização dos polímeros como a gelificação ou cristalização, o ordenamento da conformação molecular é fundamental. A espectroscopia na região do infravermelho é um dos métodos mais utilizados para obtenção do conhecimento acerca desses processos. A interação entre o polímero e o solvente no processo de formação do hidrogel é também um importante problema, e informações sobre estas interações também podem ser obtidas (OSADA et al., 2001).

Segundo Solomons & Fryhle (2011), a espectroscopia no infravermelho, fornece evidencias da presença de vários grupos funcionais na estrutura orgânica devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular. As ligações covalentes que constituem as moléculas orgânicas estão em constantes movimentos axiais e angulares. A radiação no infravermelho faz com que átomos e grupos de átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes que os ligam.

As vibrações moleculares podem ser de dois tipos: deformações axiais e deformações angulares (Figura 3). Quando a deformação ocorre na direção do eixo da molécula, à distância interatômica aumenta e diminui alternadamente e o modo de vibração é denominado estiramento ou deformação axial. As vibrações de deformação angular correspondem ao movimento de um grupo de átomos em relação ao resto da molécula, sem que as posições relativas dos átomos do grupo se alterem. Essas deformações recebem a denominação de deformação angular simétrica e assimétrica no plano e deformação angular simétrica e assimétrica fora do plano (STUART, 2004).

Figura 3 - Tipos de deformações axiais e angulares.



FONTE: SOLOMONS & FRYHLE (2011).

A rigidez das ligações é medida pela constante de força K. Esta é a mesma constante da lei de Hooke para força de restauração de uma mola. Força = – K x (deslocamento) (STUART, 2004). Em suas vibrações, as ligações covalentes comportam-se como se fossem molas minúsculas conectando os átomos, quando os átomos vibram, elas podem vibrar apenas em determinadas frequências, como se as ligações estivessem “sintonizadas”. Em função disso, os átomos ligados covalentemente têm apenas níveis de energia vibracionais específicos. A excitação de uma molécula de um nível de energia vibracional para outro ocorre apenas quando o composto absorve a radiação no infravermelho de uma energia específica, significando um comprimento de onda ou frequência específico, desde que:

$$\Delta E = h \times v$$

onde ΔE é a diferença de energia entre dois estados quantizados, h é a constante de Planck e ν é a freqüência do número de oscilações eletromagnéticas na distância em que a luz viaja em um segundo.

A frequência de uma determinada vibração de estiramento em um espectro no infravermelho pode estar relacionada aos seguintes fatores: massa relativa dos átomos; constante de força das ligações; geometria dos átomos. Átomos leves vibram a frequências mais altas do que os átomos mais pesados. As ligações triplas são mais rígidas do que as duplas, que são mais rígidas que as ligações simples, logo as ligações triplas vibram a frequências mais altas. O valor numérico da frequência de absorção pode ser estimado através da equação matemática derivada da lei de Hooke (STUART, 2004):

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi C}\left(\frac{f}{\frac{M_x \cdot M_y}{M_x + M_y}}\right)^{\frac{1}{2}}$$

onde, $\bar{\nu}$ = frequência vibracional em cm^{-1};

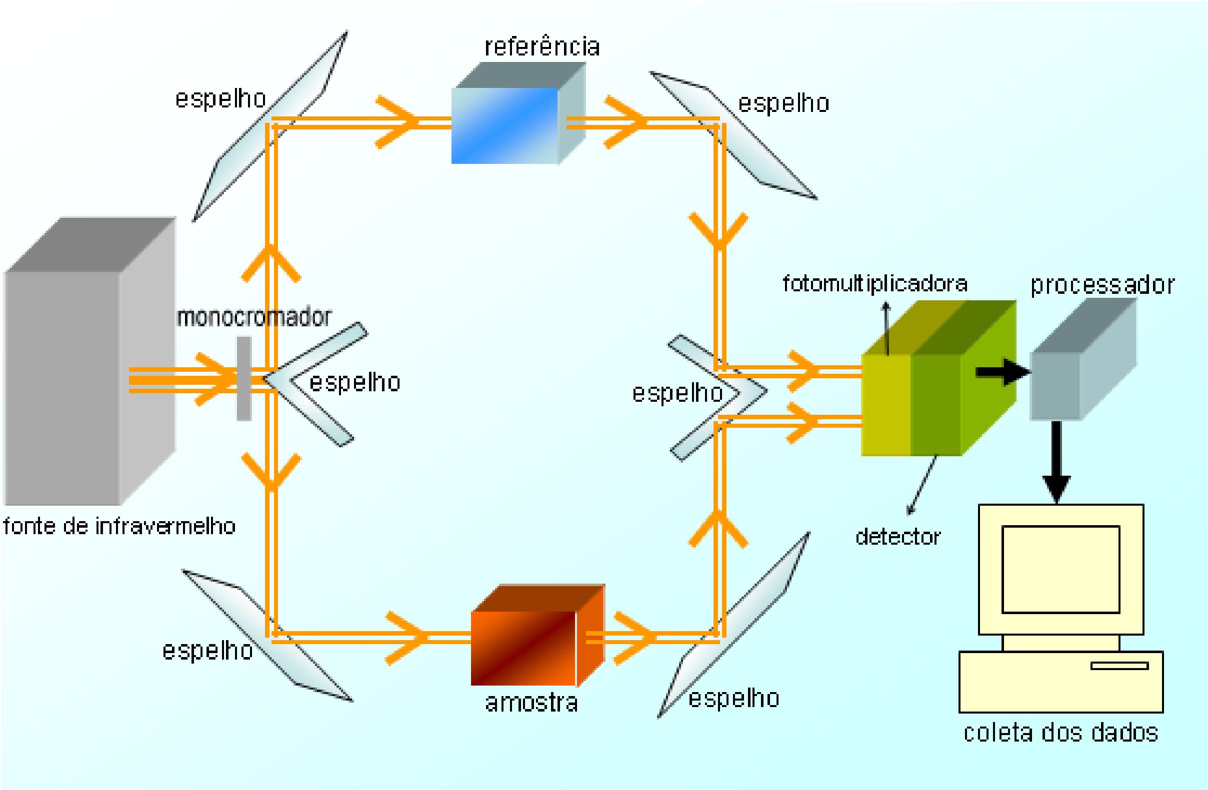
C = velocidade da luz em cm/seg;

f = constante de força de ligação em dinas/cm;

M_x e M_y = massas dos átomos X e Y em gramas.

A vantagem em se utilizar a espectroscopia na região do infravermelho está na pequena quantidade de amostra necessária (miligramas) e alta resolução dos espectros quanto à utilização de amostras secas, além de não ser agressivo (PEREIRA et al., 2003). Contudo, a técnica convencional necessita de procedimentos técnicos laboriosos para obter espectros com uma boa relação sinal/ruído (CHOPIN & WHALEN, 1993). Esta limitação foi superada com o desenvolvimento de técnicas de infravermelho utilizando o interferômetro proposto por Michelson associado ao algoritmo transformado de Fourier (Figura 4), dando origem à espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (SMITH, 2011). A radiação que emerge da fonte é passada através de um interferómetro para a amostra antes de atingir um detector. Após a amplificação do sinal, no qual as contribuições de alta frequência são eliminadas por um filtro, os dados são convertidos para a forma digital por um conversor analógico/digital e transferidos para o computador pela transformação de Fourier.

Figura 4 - Componentes básicos de um espectrofotômetro FITR.



FONTE: Adaptado de STUART (2004).

Na análise estrutural de géis poliméricos (OSADA et al., 2001), para uma boa caracterização, faz-se necessário o estudo dos espectros em separado dos polímeros envovidos na formação da estrutura em rede do gel. Nesta análise, em geral, cinco regiões podem ser distinguidas no espectro normal (entre 4000 e 400 cm^{-1}):

(1) Região de estiramentos O–H e C–H, entre 3600 e 2800 cm^{-1};

(2) Região de simetria local, entre 1500 e 1200 cm^{-1};

(3) Região de estiramentos C=O, entre 1200 e 950 cm^{-1};

(4) Impressão digital ou região anomérica, entre 950 e 700 cm^{-1};

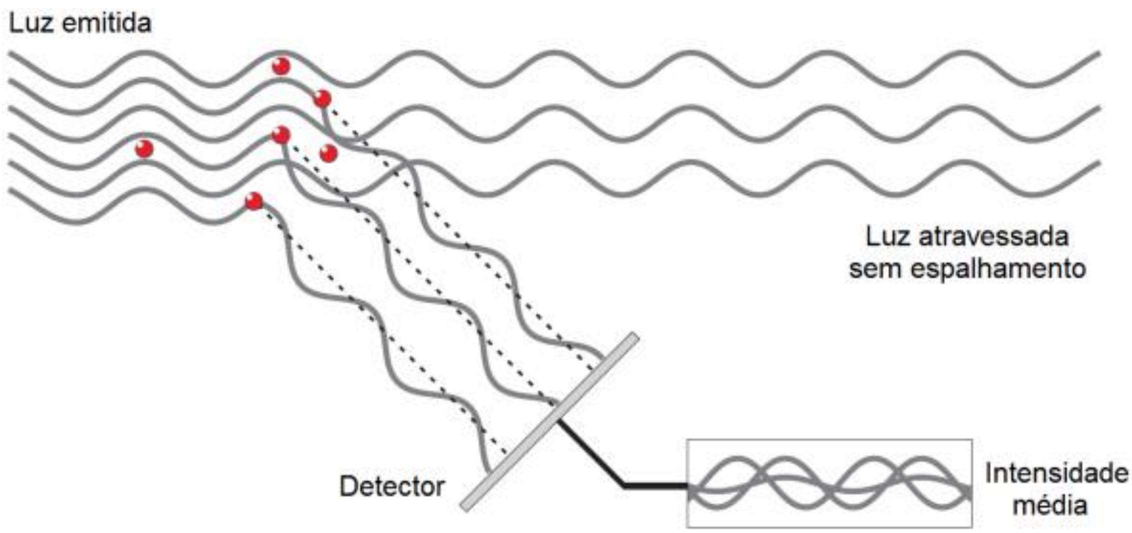
(5) Região esquelética, abaixo de 700 cm^{-1}.

3.2.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

A teoria de espalhamento de luz dinâmico (*Dinamic Light Scattering* – DLS) é uma técnica utilizada para medir o tamanho de partículas na faixa de nanômetros ou mesmo microns. O conceito usa a ideia que pequenas partículas em suspensão se movem aleatoriamente (movimentos "Brownianos"). Partículas maiores se movimentam mais lentamente que partículas menores se a temperatura é a mesma e, de acordo com a Teoria Cinética Molecular de Einstein, moléculas que são muito menores são capazes de mudar suas direções e velocidades (LUCAS, SOARES & MONTEIRO, 2001). Na análise de géis, a técnica de DLS é capaz de identificar e medir o tamanho das partículas de soluções poliméricas que se aglomeram durante o processo de gelificação além de estruturas ramificadas de microgéis (OSADA et al., 2001).

Através do DLS pode-se obter o coeficiente de difusão das macromoléculas presentes na solução polimérica, a partir da análise da distribuição de frequência na intensidade de luz espalhada em uma dada direção, isto é, a detecção da intensidade de luz espalhada a um ângulo fixo. Essas flutuações originam-se das variações no índice de refração dentro do volume de espalhamento, devido ao "movimento Browniano" das partículas (LUCAS, SOARES & MONTEIRO, 2001). Dessa forma, relaciona-se o tamanho das partículas com a mudança na frequência da luz (Figura 5).

Figura 5 - Esquema de um espalhamento de luz dinâmico.

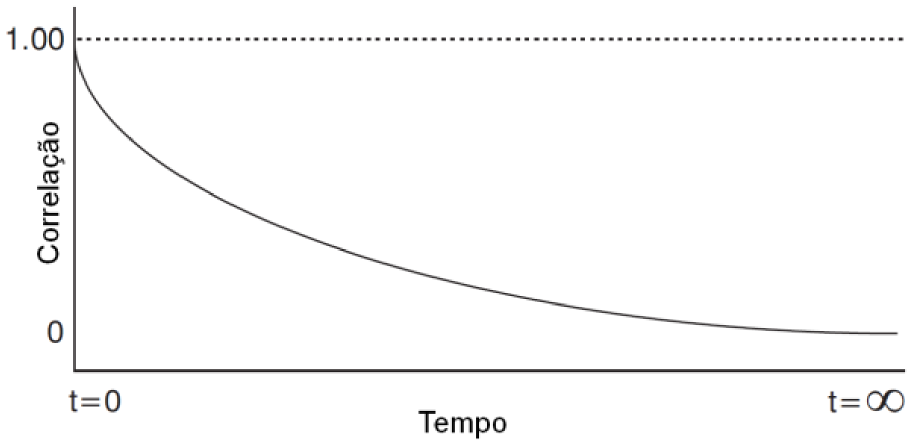


FONTE: ZETASIZER NANO SERIES - User Manual (2004).

Devido à maior velocidade de partículas menores, há uma maior mudança na frequência comparada a partículas maiores e é essa diferença que é usada para caracterizar um histograma de distribuição de tamanho de um “pool” de partículas. Contudo, esta mudança na frequência é bastante influenciada pelo “efeito Doppler”. Este é um efeito bem conhecido de acordo com o qual a frequência da fonte de movimento (a macromolécula) é deslocada para valores mais altos ou mais baixos se a fonte estiver movendo-se para mais perto ou mais longe do detector em função do tempo (LUCAS, SOARES & MONTEIRO, 2001).

Considerando a intensidade média do sinal detectado em um tempo “t”, com a intensidade de um sinal detectado em um tempo final “t_f”, os dois sinais não terão qualquer relação entre si, pois as partículas se movem em direções aleatórias (devido ao “movimento Browniano”). Nesta situação, é dito que não há nenhuma correlação entre os dois sinais. Contudo, no DLS a escala de tempo de detecção (δt) é muito pequena (na ordem de 1μs ou menor), e a perfeita correlação de sinais em um tempo “t” é reportada como 1 e a não correlação de sinais como 0. Se a medida dos sinais for contínua em ($t + 3\delta t$), ($t + 4\delta t$), ($t + 5\delta t$), ($t + 6\delta t$), etc., a correlação de sinais eventualmente chegará a 0 (Figura 6) (LUCAS, SOARES & MONTEIRO, 2001).

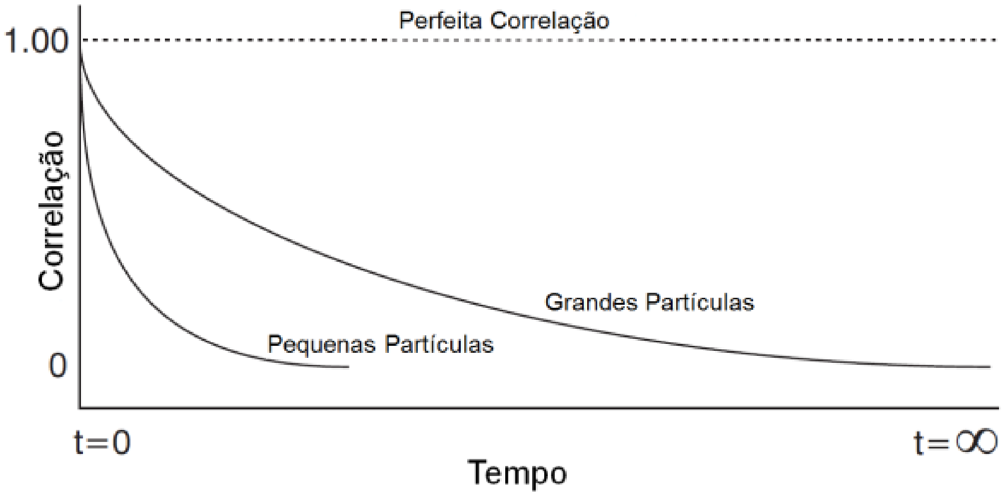
Figura 6 - Correlação de sinais em função do tempo para um aparelho de DLS.



FONTE: ZETASIZER NANO SERIES - User Manual (2004).

Partindo desse principio, se partículas de grandes dimensões estão sendo mensuradas via DLS, à medida que se movem lentamente, a intensidade do padrão de correlações de sinais detectados irá também variar lentamente. E similarmente se partículas pequenas estão sendo mensuradas, à medida que se movem rapidamente, a intensidade do padrão dos sinais flutuará rapidamente (Figura 7).

Figura 7 - Correlação de sinais em função do tempo para partículas de pequenas e grandes dimensões.



FONTE: ZETASIZER NANO SERIES - User Manual (2004).

Depois da função de correlação ser determinada, a mesma pode então ser utilizada para calcular o tamanho das partículas em uma solução. O aparelho de DLS utiliza algoritmos para extrair as taxas de decaimento desta correlação de sinais (*D*) e as converte no que se conhece como raio hidrodinâmico (R_h) (Figura 8), através da Equação de Stokes-Einstein (LUCAS, SOARES & MONTEIRO, 2001):

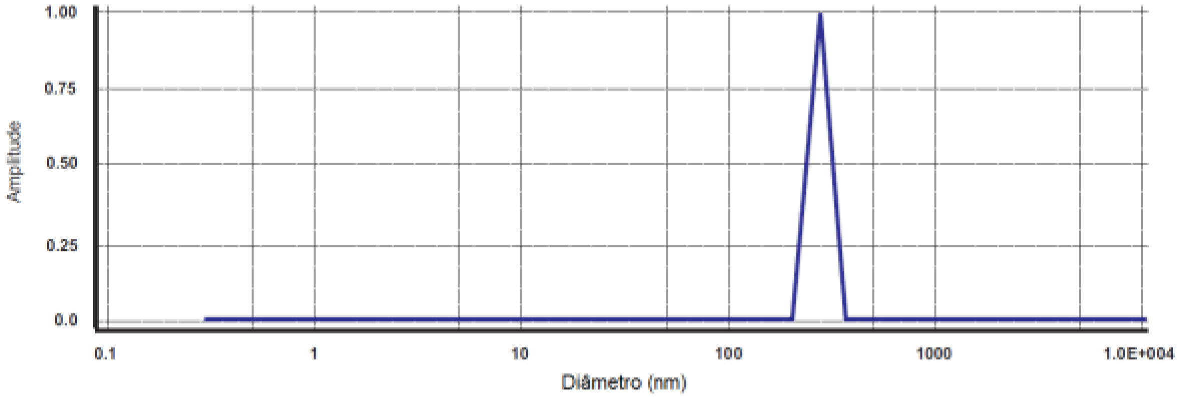
$$R_h = \frac{kT}{(6\pi\eta D)}$$

onde, *k* = constante de Boltzmann;

T = temperatura em Kelvin;

η = viscosidade do solvente.

Figura 8 - Exemplo da distribuição do tamanho médio das partículas em uma solução em função da intensidade da correlação de sinais gerada por um aparelho de DLS.



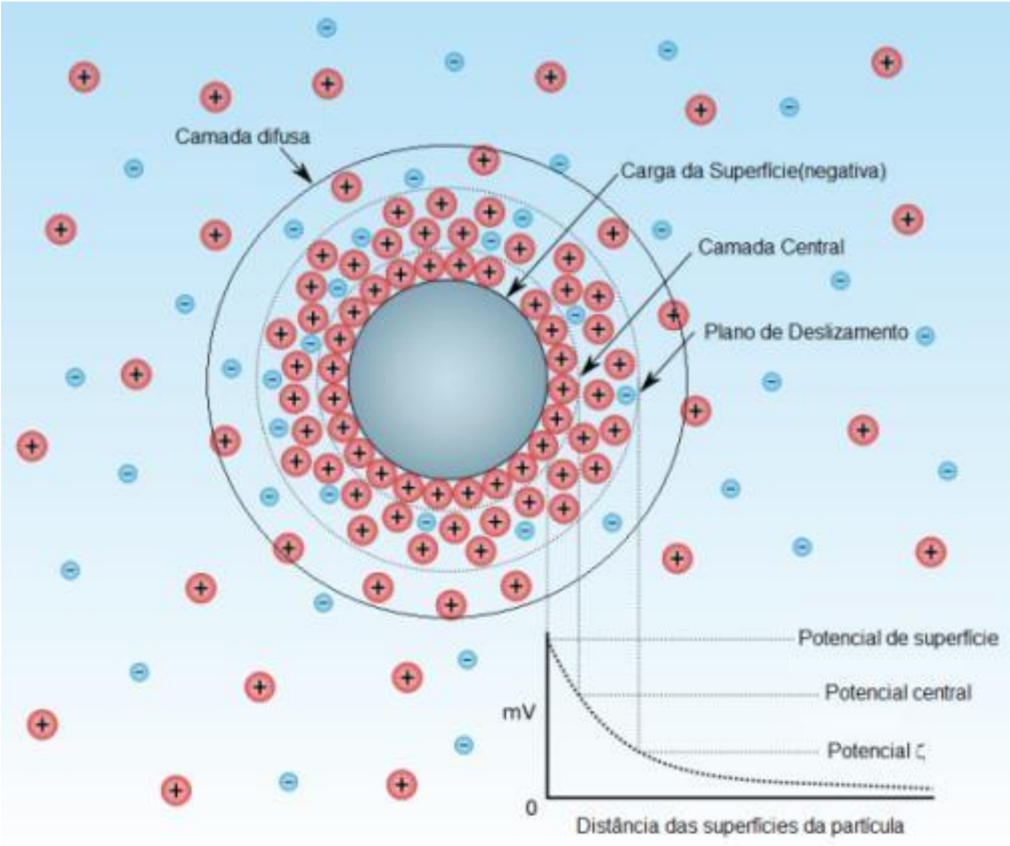
FONTE: ZETASIZER NANO SERIES - User Manual (2004).

3.2.3 Potencial Zeta (ξ)

O potencial zeta (ξ) das amostras planas representa o comportamento elétrico da superfície que ocorre na presença de uma solução aquosa. Ele dá informação sobre a natureza e a dissociação de grupos reativos (funcionais), a polaridade, hidrofilicidade ou hidrofobicidade de uma superfície sólida e, indiretamente, a natureza química da amostra estudada a cerca de íons e solvatação da água (DELGADO et al., 2005; HUNTER, 1981). Esta informação é importante para a caracterização de géis poliméricos, pois todo polímero em solução apresenta um potencial zeta, ou carga elétrica superficial. A sua medição e conhecimento é crucial para aperfeiçoar o processamento de preparo dos géis, prevendo estabilidade das formulações, interações entre os polímeros envolvidos, além de servir como um método de controle de qualidade (HUNTER, 1981).

Em solução, a presença de uma carga líquida sobre uma partícula afeta a distribuição dos íons que a rodeiam, o que resulta em um aumento na concentração de contra íons. A região em que essa influência se estende é chamada de dupla camada elétrica, a qual, convencionalmente, é considerada como a existência de duas regiões separadas, a camada central e a camada difusa (Figura 9). No entanto, o potencial zeta não é igual ao potencial central ou o potencial de superfície da dupla camada (KIRBY, 2009), porque estas são definidas em locais diferentes. A camada central é a região próxima da partícula na qual os íons estão fortemente ligados, enquanto a camada difusa é a região afastada onde os íons estão fracamente associados.

Figura 9 - Diagrama que mostra a concentração iônica e a diferença de potencial em função da distância da superfície carregada de uma partícula em suspensão num meio de dispersão.



FONTE: Adaptado de KIRBY (2009); HUNTER (1981).

À medida que a partícula se move através da solução, devido à gravidade ou uma tensão aplicada, os íons movem-se juntamente. A alguma distância a partir da partícula, não existe um "limite", existirão íons que não se moverão mais com a partícula. Esta é conhecida como a superfície de corte hidrodinâmico, ou o plano de deslizamento que existe em algum lugar dentro da camada difusa. É o potencial que existe no plano de deslizamento que é definido como o potencial zeta (HUNTER, 1981).

O potencial zeta é um indicador chave da estabilidade de soluções poliméricas. A magnitude do potencial zeta indica o grau de repulsão eletrostática entre partículas adjacentes, igualmente carregadas em uma dispersão. Para moléculas e partículas que são suficientemente pequenas, um potencial zeta elevado irá conferir estabilidade, ou seja, a solução ou dispersão irá resistir à agregação. Quando o potencial é baixo, forças atrativas podem exceder essa repulsa e a dispersão pode quebrar e flocular (HANAOR et al., 2012; GREENWOOD & KENDALL, 1999). Então, soluções poliméricas com elevado potencial zeta (negativo ou positivo) são eletricamente estáveis, enquanto as que apresentam baixos potenciais zeta tendem a coagular ou flocular, conforme descrito na tabela 3.

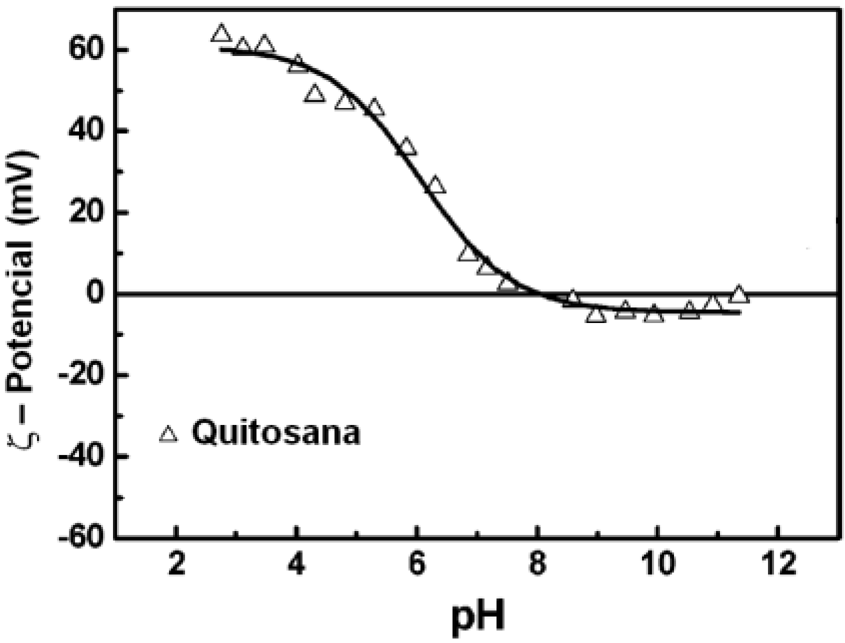
Tabela 3 - Estabilidade de soluções poliméricas em função do potencial zeta.

Potencial zeta (mV)	**Comportamento**
De 0 a ±5	Rápida coagulação ou floculação
De ±10 a ±30	Estabilidade incipiente
De ±30 a ±40	Estabilidade moderada
De ±40 a ±60	Boa estabilidade
Maior que ±61	Excelente estabilidade

FONTE: HANAOR et al. (2012); GREENWOOD & KENDALL (1999).

Outra consideração importante quando a respeito do potencial zeta é sua estreita relação com o pH da solução polimérica (HUNTER, 1981). Em uma solução contendo partículas em suspensão com um potencial zeta negativo, por exemplo, à medida que se eleva o pH (mais alcalino) desta suspensão, as partículas tendem a adquirir uma carga mais negativa. Por outro lado, adicionando ácido a esta suspensão, chegará a um ponto onde a carga negativa será neutralizada, e qualquer outra adição de ácido pode causar uma acumulação de carga positiva. Portanto, um potencial zeta em função da curva de pH vai ser positivo a baixos valores de pH e negativo a altos valores de pH. Ao ser neutralizada, a carga das partículas exibiram o que se chama de ponto isoelétrico, um determinado valor do pH da solução em que a carga líquida sobre as partículas é zero. Neste ponto, a suspensão é altamente instável e a presença de floculação é mais frequente (Figura 10).

Figura 10 - Potencial zeta da quitosana em função do pH.



FONTE: YU et al. (2006).

De todas as técnicas utilizadas para se determinar o potencial zeta de polímeros, a mobilidade eletroforética continua sendo a mais empregada (YU et al., 2006; CARNEIRO-DA-CUNHA et al., 2011; HANAOR et al., 2012; SOARES et al., 2014). Um campo elétrico é aplicado através de uma amostra, o que induz a mover as partículas carregadas. A direção e a velocidade (mobilidade electroforética) das partículas dependem do campo elétrico aplicado. A velocidade de uma partícula num campo eléctrico é dependente da: força do campo eléctrico, constante dielétrica do líquido, viscosidade do líquido e do potencial zeta (HUNTER, 1981). Ao medir diretamente a mobilidade electroforética de uma partícula, o potencial zeta pode ser então determinado utilizando a equação de Henry:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\xi f(Ka)}{3\eta}$$

onde, ζ = potencial zeta;

U_E = mobilidade eletroforética;

ε = constante dielétrica;

η = viscosidade;

f(Ka) = função de Henry.

A função de Henry geralmente tem valor 1,5 ou 1,0. Para a medição do potencial zeta em soluções aquosas de concentração eletrolítica moderada, o valor de 1,5 é utilizado e referido como a aproximação de Smoluchowski. Por outro lado, se a medição do potencial zeta for realizada para um solvente não polar, a aproximação de Huckel deverá ser utilizada, onde *f*(Ka) é definido como 1,0 (HUNTER, 1981).

3.2.4 Absorção de Água

A utilização de polímeros superabsorventes no preparo de novos biomateriais vem sendo alvo de muitas pesquisas, principalmente àquelas voltadas ao mercado consumidor, como fraldas de papel e produtos sanitários, aditivos para reter a umidade do solo, materiais para manter a umidade, materiais de construção anticongelamento, perfumes em gel e drogas de liberação controlada (ISLAM, RAHAMAN & YEUM, 2015; YANG et al., 2014b; FARKISH & FALL, 2013; CHANG et al., 2010; GUILHERME et al., 2005). No que diz respeito a esses novos biomateriais, uma adequada avaliação é fundamental para melhorias na confiabilidade desses produtos. E para os mesmos serem aceitos pelo seu uso real, o estabelecimento de um método de avaliação padrão é essencial (OSADA et al., 2001).

A técnica de absorção de água é uma das mais utilizadas na caracterização de géis e biomateriais poliméricos superabsorventes. Esta é definida como a água que é absorvida pelo gel quando um polímero altamente absorvente foi inchado em solução (água de troca iônica ou solução salina) e atingiu o equilíbrio. O método de medição geral, e também o mais simples, envolve a imersão da amostra em uma solução por um determinado período de tempo especificado a fim de medir o peso ou o volume do gel dilatado, sendo a taxa de absorção calculada segundo a seguinte equação (OSADA et al., 2001):

$$A_A(\%) = \left[\frac{(W_w - W_D)}{W_D}\right] \times 100$$

onde, A_A = taxa de absorção de água (%);

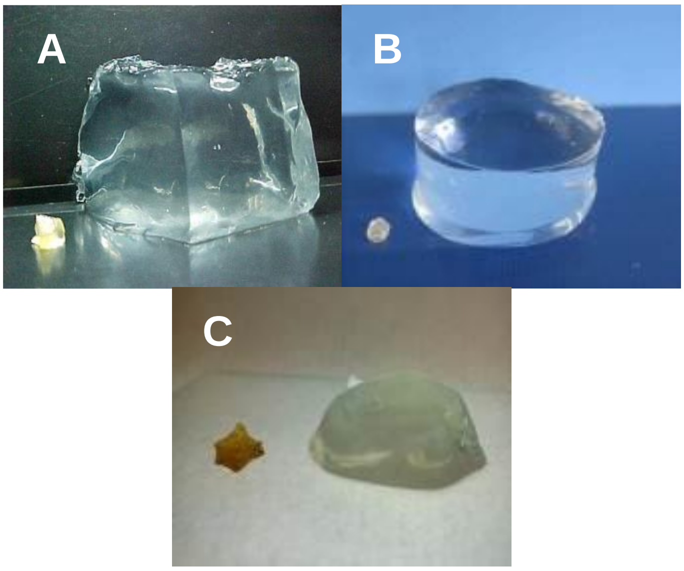
W_W = peso do material inchado;

W_D = peso do material seco.

Os polímeros que apresentam a melhor capacidade de absorção de água são os portadores de grupos iônicos, sobretudo carboxilas. Outros géis com boa capacidade de absorção contêm grupos sulfatados e fosfatos. A enorme expansão da rede se explica pelo caráter eletrolítico desses polímeros devido à presença dos grupos carregados (contra íons) que desenvolvem uma grande pressão de inchamento nas cadeias macromoleculares. Além disso, a presença de íons metálicos na solução (Na^+ e K^+, por exemplo) e o pH do meio, influenciam bastante na capacidade de absorção de água. (OSADA et al., 2001).

Guilherme et al. (2005) e Chang et al. (2010), através de modificações química na estrutura do polissacarídeo da goma do cajueiro e da celulose, respectivamente, foram capazes de desenvolver hidrogéis superabsorventes, com uma taxa de absorção de água cerca de 1500 vezes (hidrogel a base da goma do cajueiro) e 1000 vezes (hidrogel a base de celulose) do seu peso seco (Figura 11A e B). Soares et al. (2014), desenvolveram um hidrogel através da mistura do polissacarídeo da goma do cajueiro com a quitosana, sem modificação química na estrutura dos mesmos, e obtiveram uma taxa de absorção de água de mais de 300% do seu peso seco (Figura 11C).

Figura 11 - Exemplos de hidrogéis superabsorventes preparados através da mistura de diferentes polímeros: A – Acrilamida com o polissacarídeo da goma do cajueiro modificado com metacrilato de glicidila (GUILHERME et al., 2005); B – Celulose com carboximetilcelulose (CHANG et al. (2010); C – Polissacarídeo da goma do cajueiro com a quitosana (sem modificação química) (SOARES et al., 2014).



3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

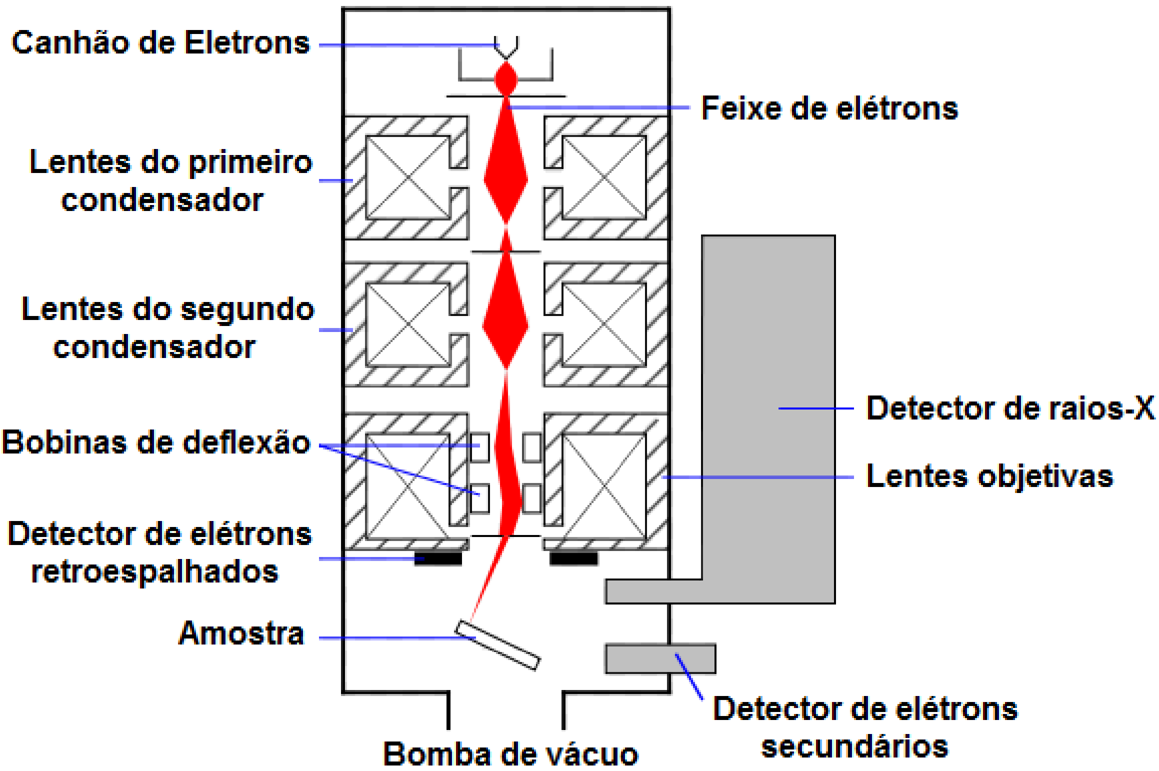
A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido um dos métodos úteis para se estudar as estruturas de géis poliméricos, permitindo sua visualização topográfica e composição. No MEV, um feixe de elétrons incidente interage com os átomos da amostra, produzindo vários sinais que são traduzidos em informações sobre a superfície onde foram refletidos (KAZMIRUK, 2012; OSADA et al., 2001).

O MEV permite a observação e caracterização de materiais orgânicos e inorgânicos heterogêneos na escala de nanômetros (nm) a micrômetros (μm), com aumentos de 10-10000 x. Os tipos de sinais produzidos a partir da interação do feixe de elétrons com os átomos da amostra incluem elétrons secundários, elétrons retroespalhados, raios-X característicos e outros fótons de várias energias. Estes sinais são obtidos a partir de volumes de emissão específicos na amostra e pode ser usado para examinar muitas características da amostra (topografia de superfície, cristalografia, composição, etc.) (KAZMIRUK, 2012; GOLDSTEIN et al., 2003).

Os sinais de imagem de maior interesse são os elétrons secundários e retroespalhados porque estes variam principalmente como resultado das diferenças na topografia da superfície da amostra (GOLDSTEIN et al., 2003). Materiais poliméricos não condutores, ao serem incididos pelo feixe de elétrons, não reproduzem fielmente os sinais de elétrons secundários, isso faz com que ocorram falhas de digitalização e presença de ruídos nas imagens. Eles são, portanto, geralmente revestidos com um revestimento ultrafino de material eletricamente condutor (ouro, ouro/liga de paládio, platina, ósmio, irídio, tungstênio, cromo e grafite), depositado na amostra, quer por pulverização à baixo vácuo ou por evaporação à vácuo. O revestimento metálico aumenta a relação sinal/ruído para as amostras de baixa condutividade elétrica, melhorando assim, a emissão de elétrons secundários e, consequentemente a qualidade e resolução das imagens (KAZMIRUK, 2012; GOLDSTEIN et al., 2003).

Em um MEV típico (Figura 12), um feixe de elétrons é termo-iônicamente emitido a partir de um canhão de elétrons equipado com um cátodo de um filamento de tungstênio. O feixe de elétrons, que tipicamente tem uma energia que varia de 0,2 keV a 40 keV, é focado por uma ou duas lentes do condensador a um ponto cerca de 0,4 nm a 5 nm de diâmetro. O feixe passa através de pares de bobinas de digitalização ou pares de placas de deflexão, na coluna de elétrons, tipicamente no final da lente, para desviar o feixe em eixos x e y de modo que ele varra de forma quadricular uma área retangular da superfície da amostra. Quando o feixe de elétrons primários interage com a amostra, os elétrons perdem energia por dispersão e absorção aleatória, o que se conhece como volume de interação, e que se estende a partir de menos de 100 nm a cerca de 5 mm para a superfície. Amplificadores eletrônicos de vários tipos são usados para amplificar os sinais, que são exibidos como variações no brilho no monitor de um computador. Cada pixel da imagem no computador é sincronizado com a posição do feixe do volume de interação da amostra no microscópio, e a imagem resultante é, portanto, um mapa da distribuição da intensidade do sinal a ser emitido a partir da área digitalizada da amostra (KAZMIRUK, 2012; GOLDSTEIN et al., 2003).

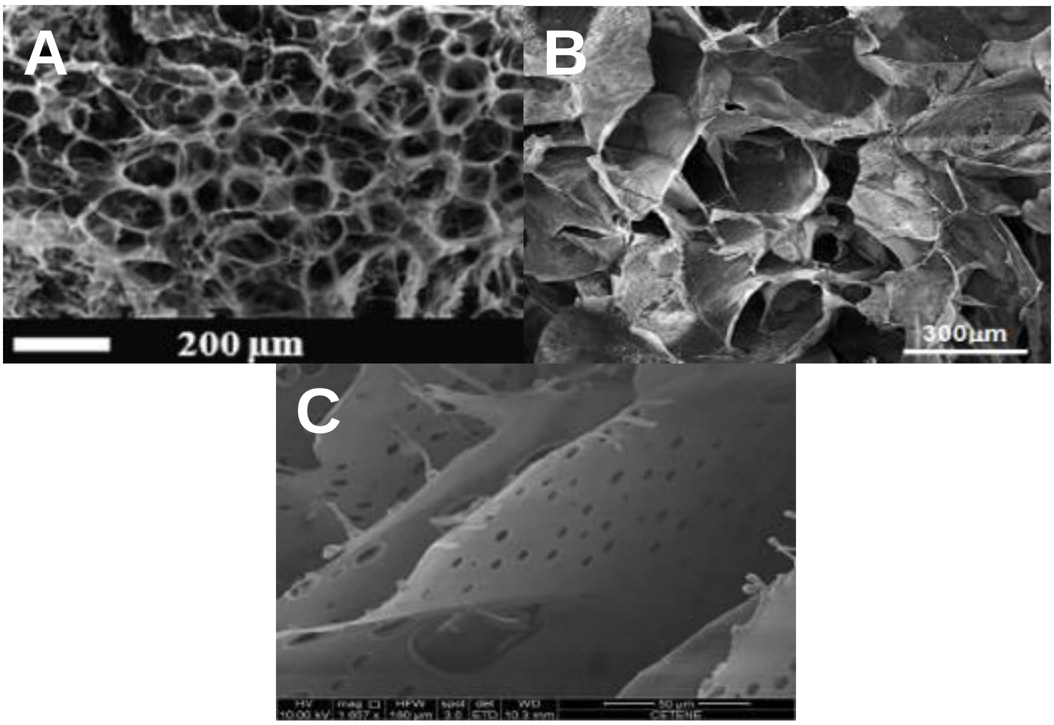
Figura 12 - Desenho esquemático da coluna eletrônica que mostra o canhão de elétrons, as lentes, o sistema de deflexão e os detectores de elétrons.



FONTE: Adaptado de GOLDSTEIN et al. (2003).

Através da microscopia eletrônica de varredura, muitos hidrogéis têm sido caracterizados, avaliando-se principalmente a estrutura de sua matriz interna, que na maioria das vezes é porosa. A quantidade de poros presentes depende do nível de interação entre as cadeias dos polímeros envolvidos, e isto é importante para a o tipo de aplicação na qual o hidrogel poderá ser aplicado. Hidrogéis para fins biomédicos, preparados a base de quitosana e goma *Acacia* (JI et al., 2011), glicol-quitosana e metacrilato (HU et al., 2012), quitosana e o polissacarídeo da goma do cajueiro (SOARES et al., 2014), tiveram suas estruturas internas analisadas através do MEV, as quais se mostraram altamente porosas (Figura 13). O método utilizado para a vizualização dos poros da matriz desses hidrogeis foi a técnica de criofratura por liofilização. Existem controversas quanto ao uso desta técnica para o estudo da matriz interna de géis e hidrogéis, pelo fato da porosidade visualizada pelo processo de criofratura não representar a porosidade da sua forma hidratada uma vez que o processo de liofilização cria artefatos. Contudo, a análise da matriz interna de hidrogéis por MEV permanence importante e continua sendo utilizada até hoje, pois estes artefatos estão relacionados com a densidade e estrutura real dos hidrogéis. As mesmas observações foram reportadas para hidrogéis de quitosana termosensíveis (ASSAAD, MAIRE & LEROUGE, 2015).

Figura 13 - Micrografias eletrônicas de varredura do interior da matriz de diferentes hidrogéis preparados através da mistura de polímeros: A – Quitosana contendo 0.5 % (p/v) de goma *Acacia* (JI, KHADEMHOSSEINI & DEHGHANI, 2011); B – Glicol-quitosana com metacrilato (HU et al., 2012); C – Quitosana com o polissacarídeo extraído da goma do cajueiro (SOARES et al., 2014).



3.2.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A chave para a análise estrutural de hidrogéis por ressonância magnética nuclear (RMN) está no fato de que os dados obtidos a partir desta técnica podem processar informações sobre a natureza química, bem como mobilidade molecular ou coletiva dos polímeros envolvidos (SHAPIRO, 2011; OSADA et al., 2001). Na maioria dos casos é dada atenção à análise da variação de deslocamentos químicos, giros temporais de relaxação ou a intensidade dos sinais de RMN, juntamente com a concentração, composição do solvente, ou à temperatura. Estes dados podem ser usados para obter informação sobre a natureza das interações intermoleculares, os valores de concentração críticas, a alteração no movimento das moléculas, ou parâmetros termodinâmicos dos polímeros associados com a formação do gel (SHAPIRO, 2011).

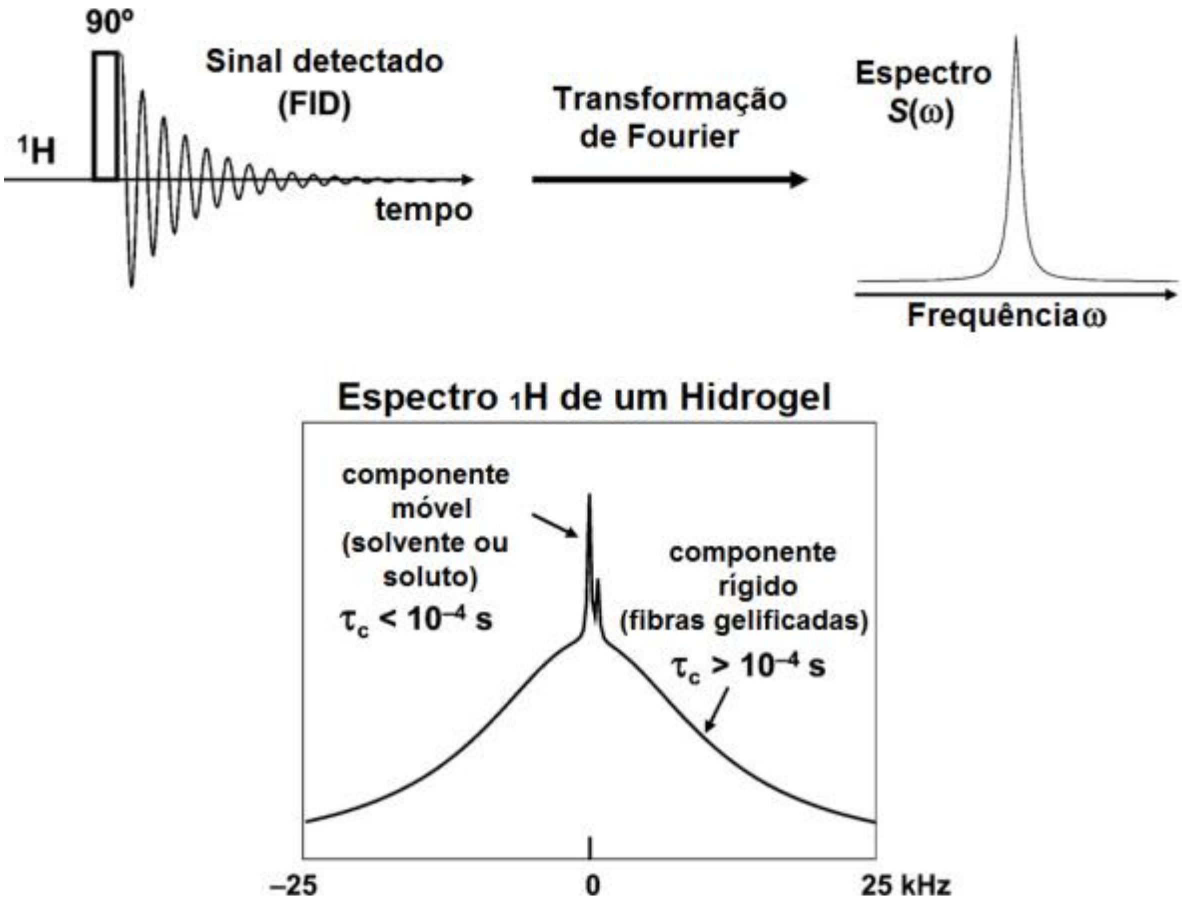
Estas observações levaram a uma melhor compreensão da microestrutura do polímero e dos mecanismos de polimerização. Com o advento de campos magnéticos elevados e os métodos espectroscópicos de RMN melhorados, tornou-se possível caracterizar em detalhes até os mínimos defeitos presentes nas cadeias dos polímeros. Os espectros de RMN são sensíveis à estrutura de nível atómico e muitos sinais são observados em um espectro de alta resolução. Além disso, é possível caracterizar compostos não só para prótons ($_{1}H$) e carbonos ($_{13}C$), mas também para quaisquer átomos de silício, azoto, fósforo ou flúor que possam estar presentes nos polímeros (SANDERS & HUNTER, 1994).

A ressonância magnética é baseada na interação entre um campo magnético externo e um núcleo que possui um movimento rotacional $I \neq 0$, e, respectivamente, um momento angular de giro. Este movimento angular no campo magnético estático externo B_0 experimenta a chamada precessão de Larmor sobre a direção do campo com a frequência:

$$\omega_0 = \gamma B_0$$

(onde, γ representa a proporção giromagnética), permitindo a magnetização do núcleo. É conveniente considerar experimentos de RMN em um quadro de coordenadas em rotação. Assim, tomando 3 coordenadas em rotação, o eixo z é a direção do campo B_0, enquanto os eixos x e y rodam em torno do eixo z com a frequência ω_0. Após um pulso de 90º de um segundo campo magnético B_1, que oscila em uma radio frequência (RF) apropriada (ressonância), a magnetização μ_i de quaisquer núcleos magnéticos *i* ($_1$H, $_2$H, $_{13}$C, $_{15}$N, $_{31}$P, etc.) em uma amostra, colocada em um campo magnético B_0, que foi inicialmente alinhado ao longo do eixo z na estrutura rotativa, torna-se agora fixo no plano xy. Esta magnetização transversal induz a um decaimento do sinal como mostrado na figura 14. A subsequente transformação de Fourier (FT) do decaimento induzido livre (FID) produz o espectro S(ω) (SHAPIRO, 2011; SANDERS & HUNTER, 1994).

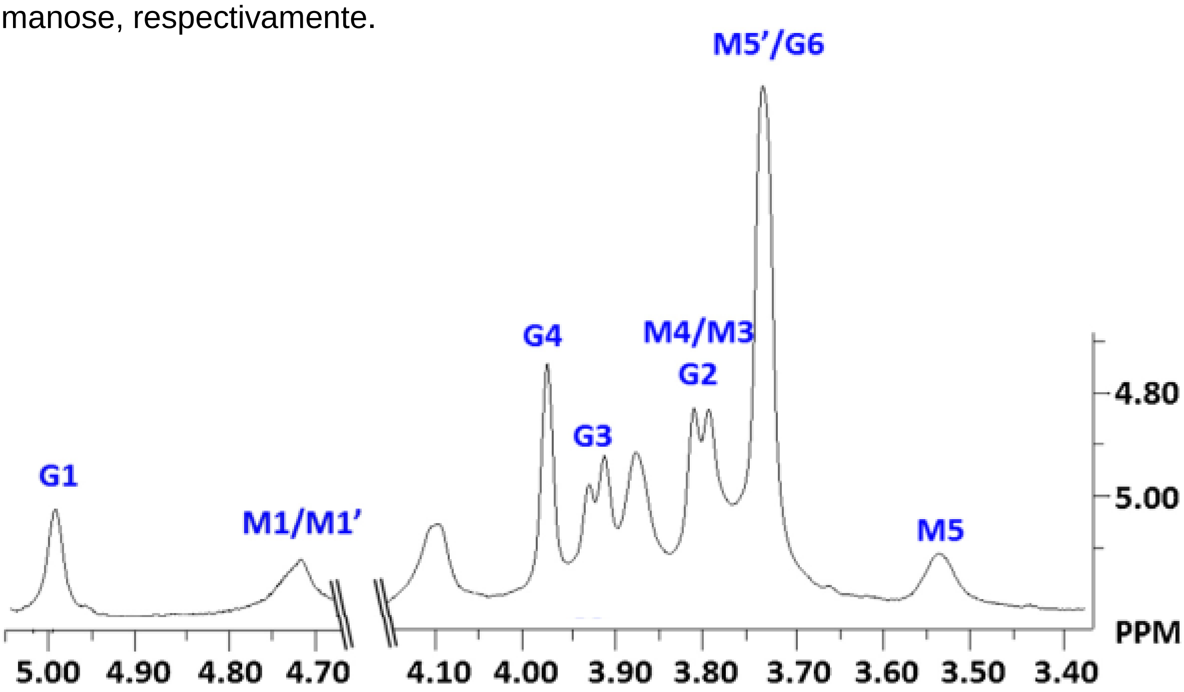
Figura 14 - Principio da espectroscopia de RMN para hidrogéis.



FONTE: SHAPIRO (2011).

As técnicas de RMN podem ser classificadas em RMN pulsada, RMN para soluções e RMN de estado sólido, e, portanto, é conveniente saber qual técnica de RMN deve ser utilizada com um líquido, solução, sólido ou cristal de uma amostra de gel. Por exemplo, utilizando a técnica de RMN para soluções em um gel polimérico, isto é, um espectro de alta resolução de um RMN para soluções, há uma combinação de movimentos rápidos e lentos dos núcleos que diminuem o rendimento do sinal. A partir dessas diferentes técnicas de RMN é possível também estudar o processo de transição sol-gel, além predizer a mobilidade das cadeias poliméricas no gel (OSADA et al., 2001). Albuquerque et al. (2014), caracterizaram através da técnica de RMN um gel de galactomanana e foram capazes de determinar todos os radicais anoméricos presentes na estrutura do polissacarídeo (Figura 15).

Figura 15 - Espectro unidimensional $_1$H RMN da galactomana extraída das sementes de *Cassia grandis*. G e M indicam os sinais das unidades da α-galactose e da β-manose, respectivamente.



FONTE: ALBUQUERQUE et al. (2014).

3.2.7 Reologia

Reologia é a ciência que lida com a deformação e fluxo da matéria (BARNES et al., 1989). Assim, a reologia de polímeros é a ciência que lida com a deformação e fluxo de materiais poliméricos. Uma vez que há uma grande variedade de materiais poliméricos, pode-se classificar a reologia do polímero em mais categorias diferentes, dependendo da natureza dos materiais poliméricos; por exemplo, (1) a reologia de polímeros homogéneos, (2) a reologia de misturas de polímeros miscíveis, (3) a reologia de misturas de polímeros imiscíveis, (4) a reologia de polímeros cheios de partículas, (5) a reologia de polímeros de fibra de vidro-reforçadas, (6) a reologia de nanocompósitos organofílicos, (7) a reologia de espumas poliméricas, (8) a reologia de termoestáveis, (9) a reologia de bloco de copolímeros, e (10) a reologia de polímeros líquido-cristalinos. Cada um destes materiais poliméricos apresenta as suas próprias características reológicas únicas (HAN, 2007).

A maioria dos materiais poliméricos exibe um comportamento prático "viscoelástico" durante o fluxo, o que significa que eles não só apresentam o comportamento viscoso, mas também o comportamento elástico no estado líquido (semelhante à borracha). A viscosidade (η) é uma das principais propriedades medidas na deformação dos fluidos e pode fornecer informações importantes sobre variações estruturais que ocorrem durante a aplicação de uma deformação ou tensão. Sendo assim, a viscosidade pode ser definida como a resistência à fluidez de um material (BARRA, 2012).

Para um melhor entendimento sobre o conceito de viscosidade, é importante ter conhecimento sobre duas propriedades reológicas: a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento (HAN, 2007). A tensão de cisalhamento é caracterizada como a força aplicada por unidade de área cisalhante, necessária para manter o escoamento de um material:

$$\tau = \frac{F}{A}$$

onde, τ = tensão de cisalhamento;

F = força necessária à fluidez;

A = área exposta ao cisalhamento.

Por outro lado, a taxa de cisalhamento está relacionada ao deslocamento relativo das moléculas do fluido:

$$\dot{\gamma} = \frac{ə_v}{ə_y} = \frac{ə_y}{ə_t}$$

onde, $\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento;

əv = variação da velocidade entre as moléculas do fluido;

$ə_y$ = distância entre as moléculas;

$ə_y/ə_t$ = a variação da deformação em função do tempo.

Os materiais poliméricos (géis, por exemplo), fogem a regra dos fluídos ideais de Newton, e, portanto, são ditos não newtonianos e podem ser classificados em pseudoplásticos, dilatantes e plásticos (SCHRAMM, 2006), isto é:

- Materiais pseudoplásticos: apresentam uma diminuição na viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta. Isso ocorre porque, no repouso, as partículas e/ou as cadeias poliméricas que o compõem encontram-se desordenadas, entrelaçadas ou enoveladas, o que gera uma alta viscosidade. Com o aumento das taxas de cisalhamento, as partículas se orientam em direção ao fluxo e as moléculas poliméricas se desenovelam ou se desagregam e se alinham em direção ao fluxo, permitindo uma maior facilidade de escoamento, apresentando, assim, uma diminuição da viscosidade (SCHRAMM, 2006). Este tipo de comportamento é observado na maioria das soluções concentradas de polissacarídeos (ALBUQUERQUE et al., 2014; SOARES et al., 2014; PINHEIRO et al., 2011).
- Materiais dilatantes: apresentam um comportamento inverso aos dos pseudoplásticos, ou seja, apresentam um aumento da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (SCHRAMM, 2006).
- Materiais plásticos: apresentam fragilidade à mínima tensão aplicada. Estes apresentam ligações intermoleculares que formam uma rede entrelaçada, a qual lhe dá a aparência de material sólido, contudo quando uma força externa aplicada é superior àquela que mantém esta rede, observa a ruptura do material (SCHRAMM, 2006).

Ainda no que diz respeito à classificação reológica dos materiais poliméricos, estes ainda podem apresentar um comportamento reológico dependente do tempo, sendo classificados como tixotrópicos ou reopéticos. Quando se aplica uma tensão aos materiais tixotrópicos, ocorre uma diminuição na viscosidade aparente, porém, no repouso, tais materiais são capazes de retornar a condição inicial. Em contrapartida, os fluidos reopéticos apresentam um aumento na viscosidade aparente com o tempo à medida que se aplica uma tensão e, retornam às condições iniciais quando a tensão é removida (HAN, 2007).

Nos ensaios reológicos dinâmico-oscilatórios de tensão, os materiais viscosos, elásticos e viscoelásticos, são analisados quanto ao seu comportamento sólido ou líquido através dos valores de G’ (módulo de armazenamento ou elástico) e G” (módulo de perda ou viscoso). Ambos são expressos em Pascal (Pa) e compõem o módulo de cisalhamento complexo (G*), que representa a resistência total à deformação. Géis verdadeiros apresentam sempre G’>G’’ para todas as varreduras de tensão aplicadas, desde que esta encontre-se na região viscoelástica linear (RVL), isto é, as condições nas quais existe uma relação linear entre a deformação sofrida e a tensão imposta ao material. A região de viscoelasticidade linear é limitada para a faixa de amplitude para qual G* é constante, garantindo que a amostra não seja deformada ao ponto em que a ligação interna temporária da molécula ou dos agregados seja destruída, e a maior parte da energia introduzida seja irreversivelmente perdida como calor (HAN, 2007).

Polímeros que apresentam características de materiais viscoelásticos são um importante objeto de estudo no campo da reologia, uma vez que estes podem ser aplicados em diferentes ramos da indústria, como a farmacêutica, alimentícia, cosmética, de adesivos, tintas, entre outras (TONELI, MURR & PARK, 2005; HAN, 2007). Assim, em qualquer formulação do tipo gel (higiene pessoal, cosméticos, tintas, tintas para impressão, produtos farmacêuticos ou agroquímicos), existe uma necessidade em se modificar a reologia do sistema, de modo a atingir: (i) uma estabilidade física a longo prazo (uma ausência de formação de creme ou sedimentação e separação) e (ii) uma facilidade de aplicação (HAN, 2007):

- Para a maioria das formulações, um sistema de adelgaçamento por corte é necessário para se alcançar uma boa capacidade de espalhamento e no caso de produtos de higiene pessoais, um bom "toque na pele";
- Para tintas, um bom revestimento é necessário;
- Para produtos farmacêuticos, uma facilidade de fluxo é necessária para injetáveis e uma facilidade de propagação para aplicações tópicas.
- Para formulações agroquímicas, deve haver uma facilidade de fluxo a partir do recipiente e uma facilidade de dispersão em diluição.

3.2.8 Propriedades Biológicas

Com relação às propriedades biológicas (especificidade de tecidos, atividade celular e biocompatibilidade), estas irão depender muito da escolha do polímero quer ele seja de origem sintética ou natural, pois muitos apresentam características únicas que possibilitam ampla aplicação industrial, incluindo preparações farmacêuticas, direcionamento e entrega de drogas, próteses, suportes para engenharia e regeneração de tecidos, etc. (KUMBAR, LAURENCIN & DENG, 2014).

Na obtenção de hidrogéis, muitas vezes são utilizados os polímeros sintéticos devido à reprodutibilidade e propriedades químicas, como massa molar específica e o controle da densidade de ligações cruzadas entre as cadeias dos polímeros. Estas propriedades determinam a dinâmica da formação do gel e determinam também suas propriedades mecânicas e de degradação. No entanto, polímeros sintéticos, do ponto de vista biológico, frequentemente não apresentam uma bioatividade e biocompatibilidade celular desejada, o que pode traduzir-se em efeitos secundários adversos (KUMBAR, LAURENCIN & DENG, 2014).

Os polímeros naturais, por outro lado são abundantes e mais parecidos com os componentes presentes em matrizes extracelulares biológicas, podendo ser prontamente aceitos pelo corpo, uma vez que em sua grande maioria apresentam alta bioatividade e biocompatibilidade (KUMBAR, LAURENCIN & DENG, 2014). Além disso, podem ser obtidos a partir de fontes renováveis como algas, plantas e culturas microbianas (NISHINARI & TAKAHASHI, 2003; COVIELLO et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2014, ARRUDA et al., 2014), e de acordo com sua natureza química, podem ser divididos em três classes principais: os polissacáridos, as proteínas e os poliésteres.

3.3 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são considerados os biopolímeros mais abundantes e mais antigos que foram produzidos na Terra, apresentam alto peso molecular e são constituídos por 20 ou mais unidades de monossacarídeos. De maneira geral, são complexos coloidais que ao serem hidrolisados, liberam monossacarídeos contendo cinco ou seis átomos de carbono (NELSON & COX, 2008).

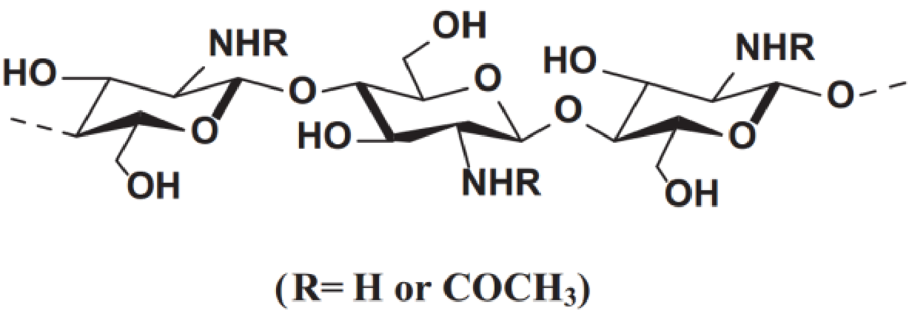
Essa classe de biopolímeros pode ser obtida de várias fontes naturais renováveis como algas, plantas, bactérias, fungos, insetos, crustáceos, animais e até mesmo humanos, e ainda podem ser sintetizados a partir de engenharia genética (LAURIENZO, 2010; D’AYALA, MALINCONICO, & LAURIENZO, 2008; COVIELLO et al., 2007; COLQUHOUNET al., 2001). Em sua forma original ou modificada quimicamente, possuem boas propriedades mecânicas para aplicações biomédicas como fibras, filmes, adesivos, plásticos processáveis fundidos, espessantes, modificadores reológicos, hidrogéis, carreadores de drogas, emulsificantes, etc (ALBANI et al., 2015; KUMBAR, LAURENCIN & DENG, 2014; ALBUQUERQUE et al., 2014; ARRUDA et al., 2014; GUO et al., 2013).

Entre os polissacarídeos que podem ser utilizados para se obter hidrogéis, muitos já são produzidos comercialmente como a quitosana e as carragenanas, por exemplo. Contudo, fontes alternativas como as galactomananas extraídas das sementes de plantas leguminosas e o polissacarídeo extraído da goma do cajueiro, também têm sido alvo de pesquisas na confecção de géis e hidrogéis (ALBUQUERQUE et al., 2014; SOARES et al., 2014, respectivamente).

3.3.1 Quitosana

A quitosana é um heteropolissacarídeo obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina, que é o segundo polissacarídeo mais abundante na Terra após a celulose (KUMBAR, LAURENCIN & DENG, 2014; GAVHANE, GURAV ATUL & YADAV ADHIKRAO, 2013). A quitina pode ser extraída a partir de espécies de fungos ou do exoesqueleto de criaturas marinhas, como lagosta, lagostim, caranguejo e camarão (MUZZARELLI et al., 1994). A quitosana (Figura 16) é composta por unidades alternadas de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranose unidas através de ligações do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (MATI-BAOUCHE et al., 2014).

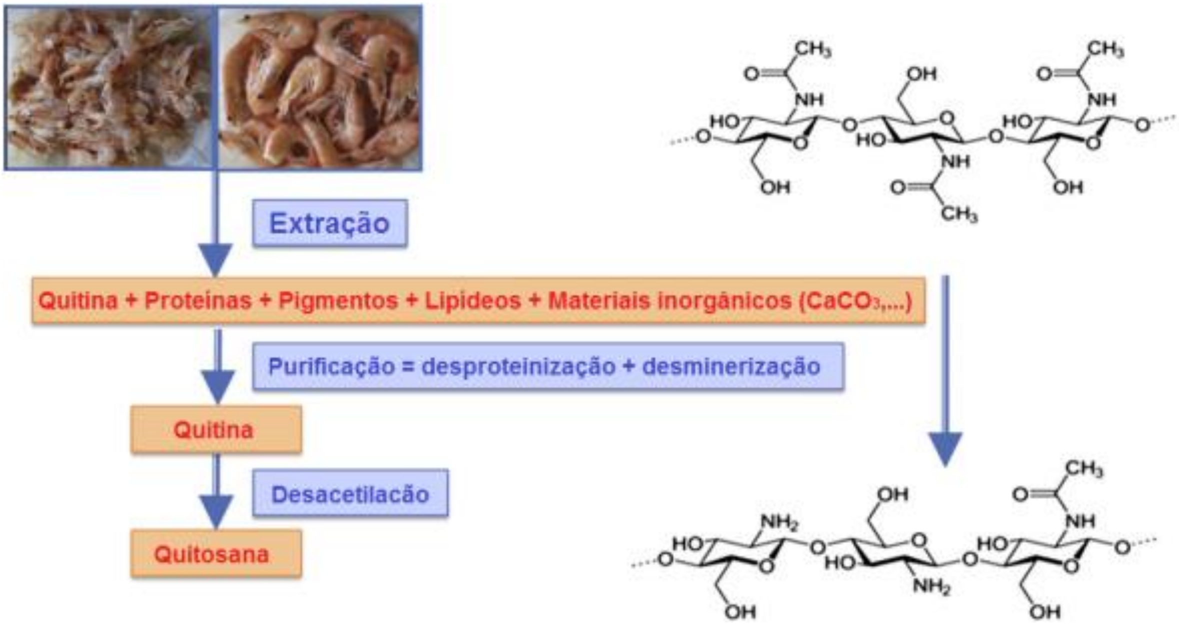
Figura 16 - Estrutura química da quitosana (% $COCH_3 \leq 40\%$).



FONTE: MATI-BAOUCHE et al. (2014).

No processo de desacetilação da quitina (Figura 17), os grupos acetila são hidrolisados para libertar os grupos amina. Resumidamente, as proteínas e minerais são primeiro removidas a partir de conchas, tratando-as com hidróxido de sódio leve ou soluções de hidróxido de potássio (entre 1% e 10% p/v), à temperaturas que variam de 30 ºC a 100 ºC durante 30 min a 12 h. Finalmente, a remoção dos grupos acetila de quitina para a obtenção de quitosana é feita utilizando um tratamento extensivo normalmente realizado com soluções alcalinas concentradas (NaOH ou KOH). Este passo determina o grau de desacetilação (DD) ou a relação de unidades desacetiladas/acetiladas. O DD é influenciado pela temperatura, tempo e concentração do NaOH (KOH) utilizado na desacetilação (MATI-BAOUCHE et al., 2014; ABDULKARIM et al., 2013; HUSSAIN, IMAN, & MAJI, 2013).

Figura 17 - Processo de obtenção da quitosana a partir de resíduos de crustáceos marinhos.



FONTE: MATI-BAOUCHE et al. (2014).

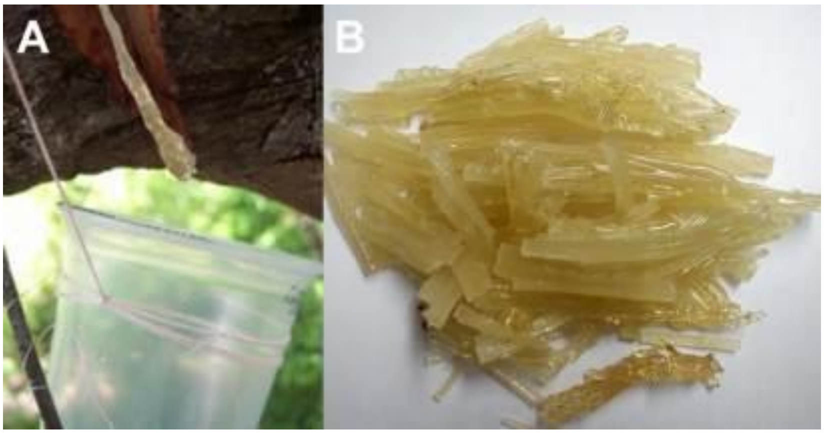
Nas áreas comerciais e científicas, o termo "quitosana" é geralmente atribuído a produtos de quitina com mais de 60% de grau de desacetilação e teor de nitrogênio superior a 7%. Esta macromolécula é uma amina alifática primária e é o único polissacárido catiônico natural devido às suas cargas positivas (NH_3^+) a pH ácido (pKa < 6,5). Portanto, a quitosana pode ser protonada por ácidos selecionados, tais como: ácido fórmico, acético, láctico, málico e cítrico (MATI-BAOUCHE et al., 2014; ROBERTS, 2008). Além disso, a quitosana possui uma excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, propriedades curativas e hemostáticas, bem como atividade antimicrobiana (ZANG et al., 2014; MIGUEL et al., 2014; MADHUMATHI et al., 2009), e por possuir tais características, a mesma tem sido bastante utilizada na produção de biomateriais, principalmente hidrogéis (KUMBAR, LAURENCIN & DENG, 2014; SOARES et al., 2014).

3.3.2 Policaju

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma arvore nativa das regiões norte e nordeste do Brasil, pertencente à família Anacardiaceae (LEITÃO et al., 2013). É uma das plantas mais utilizadas na medicina popular por possuir ação comprovada contra alguns gêneros bacterianos, e até mesmo sobre algumas moléstias, como a leishmaniose (AKINPELU, 2001), e várias condições inflamatórias, como a artrite (IWU, 1993), e asma (GIRON et al., 1991).

Por exsudação natural ou através de incisões no tronco e ramos da árvore do cajueiro aparece uma goma de coloração amarelada (Figura 18), que é solúvel em água e apresenta grande potencial de industrialização (PITOMBEIRA et al., 2015; SOARES et al., 2014; PORTO & CRISTIANINI, 2014). Por possuir característica semelhante à goma arábica (DE PAULA E RODRIGUES, 1995) pode vir a substituí-la nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias.

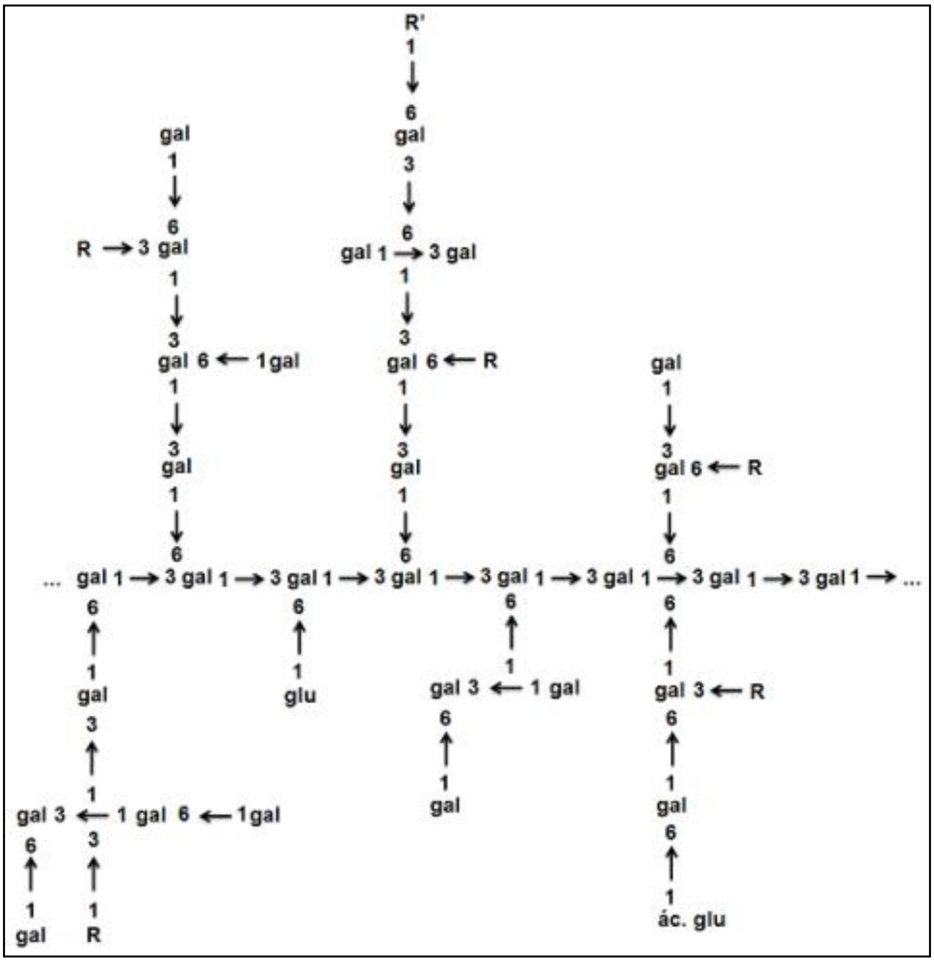
Figura 18 - Extração da goma a partir de ramos do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). A – Exsudato; B – Goma bruta seca.



FONTE: PRÓPRIO AUTOR (2015).

A partir da goma exsudada, é possível extrair um polissacarídeo ácido complexo (arabinogalactana ácida) com massa molecular de aproximadamente 160 kDa. Este heteropolissacarídeo (Figura 19), conhecido também como “Policaju”, é composto por uma cadeia principal formada por unidades de D-galactopiranose unidas por ligações glicosídicas β(1→3) substituídos em O-6, tendo como resíduos terminais a arabinose, raminose, ácido glucurônico, ácido 4-O-metilglucurônico, xilose, glicose e manose (DE PAULA E RODRIGUES,1995).

Figura 19 - Representação esquemática da estrutura do Policaju**. R representa** D–manose, D–xilose, D–raminose, D–arabinose ou cadeias de arabinose com ligação 1→2; R’ representa D-glicose ou ácido D-glucurônico.



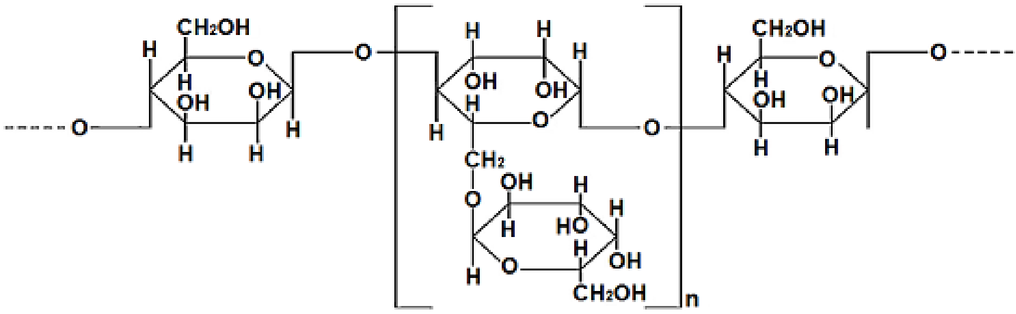
FONTE: ANDERSON & BELL (1975).

O Policaju é alvo de pesquisas científicas devido a sua capacidade emulsificante (PORTO & CRISTIANINI, 2014) e potencial para o processo de cicatrização de lesões cutâneas (MONTEIRO et al., 2007; SCHIRATO et al., 2006), além de possuir atividade antiparasitária bem como atividade antitumoral *in vitro* frente a células HeLa e células do sarcoma 180 (FLORÊNCIO et al., 2007). Em aplicações biomédicas e em alimentos, este polissacarídeo tem tido sucesso na confecção de filmes e membranas (SOUZA et al., 2010), hidrogéis (SOARES et al., 2014) e nanopartículas (PITOMBEIRA et al., 2015).

3.3.3 Galactomananas

Polissacarídeos de sementes são uma das categorias mais importantes de gomas com origem em plantas usadas na indústria alimentar, biomédica e farmacêutica, uma vez que desempenham papéis importantes tanto no processamento de alimentos, na preparação de géis e suportes para a imobilização de fármacos (PRAJAPATI et al., 2013). As galactomananas são heteropolissacarídeos constituídos por uma cadeia principal de β–(1→4)-D-manana (Figura 20) com ramificações de D-galactose unidas através de ligações α–(1→6) (ALBUQUERQUE et al., 2014; CERQUEIRA et al., 2011). Elas diferem umas das outras pela proporção dos resíduos manose/galactose (G/M). Estas gomas são obtidas a partir do endosperma de sementes de dicotiledóneas de numerosas plantas, principalmente as da família Leguminosae (PRAJAPATI et al., 2013; GIDLEY & REID, 2006).

Figura 20. Estrutura molecular geral das galactomananas.



FONTE: PRAJAPATI et al. (2013).

Atualmente existem quatro fontes principais de galactomananas obtidas a partir de sementes: alfarroba (*Ceratonia siliqua*), guar (*Cyamopsis tetragonoloba*), tara (*Caesalpinia spinosa Kuntze*) e feno-grego (*Trigonella foenum-graecum* L.). Destas, apenas as gomas alfarroba e guar são de considerável importância industrial. O uso das gomas tara e feno-grego são limitados devido à baixa disponibilidade e preço (PRAJAPATI et al., 2013). Visando o aproveitamento de fontes alternativas, novas galactomananas foram exploradas na literatura (CERQUEIRA et al., 2011). As sementes de *Cássia grandis* (Figura 21), foram utilizadas recentemente para a obtenção de galactomanana com bons rendimentos em extração (ALBUQUERQUE et al., 2014).

Figura 21 - Galactomanana extraída das sementes de *Cassia grandis*. A – vagem; B – endosperma; C – galactomanana.

FONTE: PRÓPRIO AUTOR (2015).

As Galactomananas são amplamente utilizadas na indústria, devido às suas propriedades funcionais, como espessantes, adesivos e estabilizantes. Estas propriedades são guiadas pelo comportamento reológico das galactomananas em fase aquosa e também, em certas condições, através de ligações intermoleculares. As moléculas de galactomanana hidratadas ocupam um grande volume hidrodinâmico na solução aquosa e dessa forma controlam o comportamento reológico de toda a solução (PRAJAPATI et al., 2013).

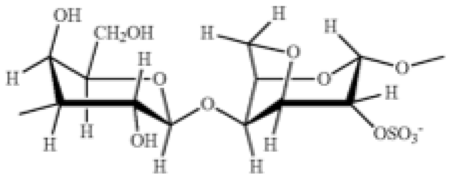
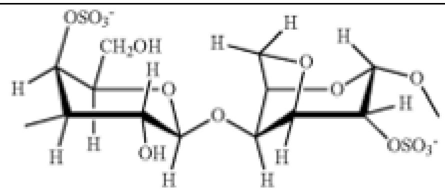
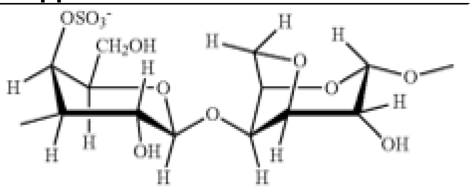
Mesmo que suas soluções apresentem elevada viscosidade, as galactomananas em si, não são agentes gelificantes (pseudogéis). Contudo, elas podem interagir sinergicamente com outros polissacárideos tais como agar, xantana, carragenana, etc., para formar, em condições apropriadas, uma rede de gel tridimensional (PRAJAPATI et al., 2013; CERQUEIRA et al., 2011; PINHEIRO et al., 2011). Dessa forma, as galactomananas podem ser utilizadas, muitas vezes, em diferentes formas para o consumo humano, quer seja na forma de filmes, revestimentos ou géis. Além disso, por apresentarem diferentes propriedades físico-químicas e serem atóxicas, as galactomananas têm encontrado espaço para muitas aplicações na indústria têxtil, farmacêutica, biomédica, cosméticos e principalmente na indústria de alimentos (BURITI et al., 2014; PRAJAPATI et al., 2013; CERQUEIRA et al., 2011). No que diz respeito ao preparo de hidrogéis, muitas pesquisas vem sendo desenvolvidas utilizando galactomananas como polissacarídeo base (KOOP et al., 2015; KONO, OTAKA & OZAKI, 2014; DA-LOZZO et al., 2013).

3.3.4 Carragenanas

Carragenanas são polissacarídeos lineares sulfatados aniônicos de ocorrência natural, extraídos de algumas algas vermelhas da família Rhodophyceae (CHEN, LIAO, & DUSTAN, 2002). O componente principal de tais algas, as chamadas carragenanas, são copolímeros constituídos por uma cadeia de β-D-galactose e 3,6-anidro-α-D-galactose, contendo uma densidade variável de grupos sulfatados (CAMPO et al., 2009). As espécies *Chondrus crispus*, *Gigartina stellata*, *Iridaea* spp., *Eucheuma* spp. e *Kappaphycus* spp. são as principais fontes utilizadas para a extração de carragena (PRAJAPATI et al., 2014).

De maneira geral, cada dissacarídeo na cadeia contém uma β-D-galactopiranose (unidade G) unida ou com uma α-D-galactopiranose (unidade D) ou uma 3,6-anidrogalactose (unidade AD) através de ligações glicosídicas α(1→3) e β(1→4). Outros resíduos de carboidratos podem fazer parte da composição das carragenanas, tais como xilose, glucose e ácidos urônicos. As unidades dissacarídicas sulfatadas variam bastante, resultando num teor de 22-38%, em peso, em carragenanas comerciais (VAN DE VELDE & DE RUITER, 2002). Outros cátions, tais como amônio, cálcio, magnésio, potássio e sódio, estão também muitas vezes presentes na forma de ésteres de galactose (FAO, 2007; US PHARMACOPEIA, 2010). Existem várias carragenanas com diferentes estruturas e propriedades químicas (MCHUGH, 2003). As três mais prevalentes (Tabela 4) e de maior interesse comercial são as formas iota (ι), kappa (κ) e lambda (λ) carragenana (FAO, 2007; US PHARMACOPEIA, 2010; VAN DE VELDE & DE RUITER, 2002). De acordo com as propriedades químicas das carragenanas, estas podem ser divididas em dois grupos: agentes gelificantes (kappa e iota) e agentes espessantes (lambda). Quanto à capacidade de formar géis, a κ-carragenana é a mais utilizada em comparação a ι-carragenana (PRAJAPATI et al., 2014).

Tabela 4 - Revisão sobre os tipos, estruturas e propriedades das carragenanas.

S.Nº.	**Propriedades**	**Tipo**		
		Lambda	**Iota**	**Kappa**
	Estrutura Química			
(1)	Solubilidade			
(a)	Água quente (80 ºC)	Solúvel	Solúvel	Solúvel
(b)	Água fria (20 ºC)	Todas solúveis em água	Solúvel em sais de Na+, Apenas tixotrópico em sais de Ca2+	Solúvel de sais de Na+, absorção limitada em sais de K+ e Ca2+
(c)	Leite quente (80 ºC)	Solúvel	Solúvel	Solúvel
(d)	Leite frio (20 ºC)	Engrossa	Insolúvel	Insolúvel
(e)	Leite frio	Aumenta o espessamento ou gelificação	Engrossa ou forma géis	Engrossa ou forma géis
(f)	Açúcar (50% p/v)	Solúvel	Insolúvel	Solúvel em aquecimento
(g)	Salina (10% p/v)	Solúvel em aquecimento	Solúvel em aquecimento	Insolúvel
(2)	Gelificação			
(a)	Efeito de cátions	Não gelifica	Géis fortes com Ca2+	Géis fortes com K+
(b)	Textura dos géis		Elástico	Quebradiço
(c)	Taxa de reversão dos géis		Sim	Não
(d)	Sinerese		Não	Sim
(e)	Histerese		5-10 ºC	10-20 ºC
(f)	Estabilidade ao gelo e desgelo	Sim	Sim	Não
(g)	Sinergismo com galactomananas	Não	Não	Sim
(h)	Sinergismo com glucomananas	Não	Não	Sim
(i)	Sinergismo com amigo	Não	Sim	Não
(3)	Tolerância a sal	Boa	Boa	Pobre
(4)	Estabilidade em ácido	Hidrólise	Hidrólise da solução, Gel estável	Acelerada pelo aquecimento
(5)	Reatividade com proteínas	Forte interação em pH ácido	-	Reação específica com κ-caseína

FONTE: PRAJAPATI et al. (2014).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novos equipamentos e tecnologia permitiu o estudo do processo de gelificação de polissacarídeos naturais (PRAJAPATI et al., 2014). No caso da κ-carragenana, a transição da forma desorganizada em bobina para a forma organizada em dupla hélice foi estudada por técnicas incluindo reologia, polarimetria e DLS (NISHINARI & TAKAHASHI, 2003; MANGIONE et al., 2003), transmissão de fótons (KARA et al., 2003), espectrofotometria (MACARTAIN, JAACQUIER & DAWSON, 2003), espalhamento de raios-X em baixa amplitude (YUGUCHI, URAKAWA, & KAJIWARA, 2003), calorimetria exploratória diferencial (NAYOUF, 2003) e dispersão de luz durante a deformação (TAKEMESA & CHIBA, 2001). Todas estas técnicas têm confirmado a associação de duas fitas lineares de κ-carragena para formar uma dupla hélice durante a gelificação, reafirmando o mecanismo proposto por Rochas (1982).

A carragenana não tem valor nutricional, mas tem sido utilizada na indústria alimentar no encapsulamento de óleos essenciais (DILMA et al., 2014), na indústria farmacêutica como excipiente em comprimidos e cápsulas (CAMPO et al., 2009) e como uma potente matéria-prima na confecção de hidrogéis (LI et al., 2014; CHEN et al., 2013; HEZAVEH & MUHAMAD, 2013). Nas aplicações farmacêuticas e na medicina experimental, a carragenana é muitas vezes utilizada em ensaios mobilizando agentes anti-inflamatórios (SOLANKI et al., 2015).

A atividade biológica de carragenana como um polissacarídeo de ocorrência natural tem sido amplamente empregada em aplicações humanas criando uma forte posição na área biomédica. Devido às suas diferentes estruturas químicas e propriedades físicas, as carragenanas podem ser utilizadas em diferentes aplicações, desde a engenharia de tecidos como também na preparação de veículos para a liberação controlada de fármacos (PRAJAPATI et al., 2014).

3.4 – HIDROGÉIS OBTIDOS A PARTIR DA MISTURA DE DIFERENTES POLISSACARÍDEOS

Sistema de mistura de polissacarídeos são utilizados em várias aplicações biotecnológicas devido à sua capacidade de interagirem sinergicamente (MANNION et al., 1992) e renderem novos materiais com propriedades controladas. Interações sinérgicas entre polissacarídeos são bastante atrativas para a indústria de alimentos, pois possuem o potencial de criar novas texturas e manipular a reologia dos produtos (SWORN, 2000).

No campo farmacêutico, várias pesquisas têm sido desenvolvidas no preparo de hidrogéis formulados a partir de polímeros naturais. Contudo, foi demonstrado que hidrogéis constituídos de um único polímero, na maioria das vezes, não conseguem atender às demandas divergentes em termos de propriedades físico-químicas e bioatividades (AHMED, 2013). De maneira a melhorar as propriedades dos géis, novas misturas entre polissacarídeos têm sido desenvolvidas nos últimos anos (JANG et al., 2014b; DIAO et al., 2014; DASH, FOSTON & RAGAUSKAS, 2013; AHMED, 2013; MARTINS et al., 2012). Tais sistemas incluem hidrogéis, blendas poliméricas, matrizes de copolímeros interpenetradas ou semi-interpenetradas, e que apresentam amplas propriedades devidas às características únicas dos polímeros envolvidos (KOOP et al., 2015; LIU et al., 2014c; LV et al., 2014; VUDJUNG et al., 2014; BHATTACHARYYA & RAY, 2014).

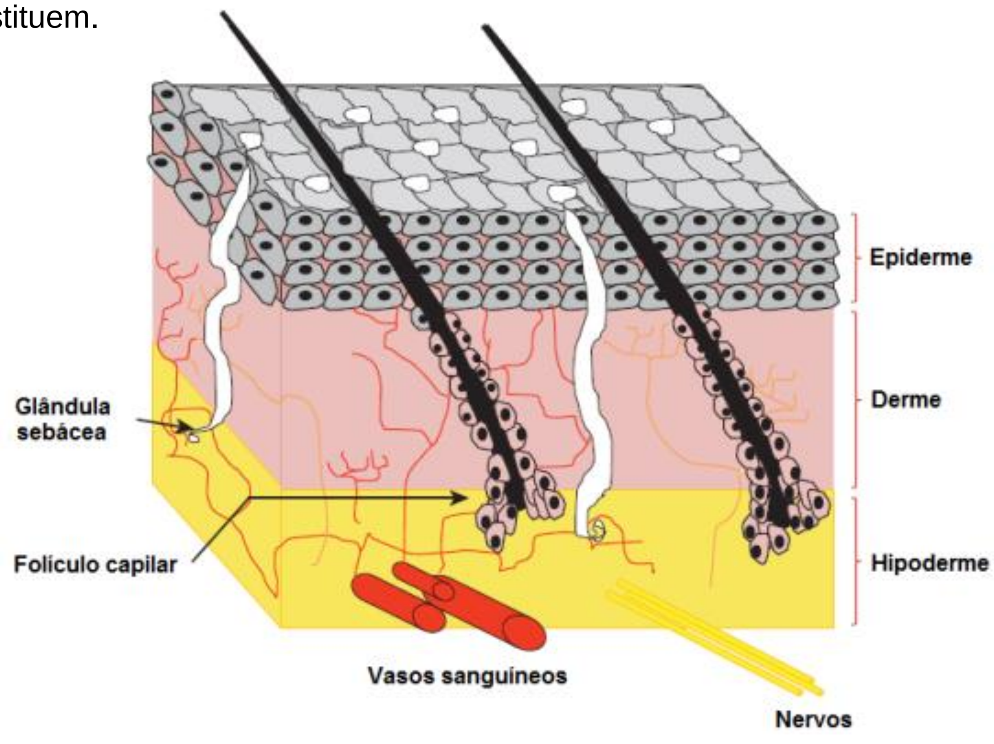
Misturas entre o polissacarídeo da goma do cajueiro (Policaju) e quitosana têm encontrado espaço no desenvolvimento de hidrogéis, para a liberação controlada de biomoléculas (PAULA et al., 2011; MACIEL et al., 2005) e controle de pragas (PAULA, DE PAULA & BEZERRA, 2005) e até nanogéis para encapsulamento de óleos essenciais (ABREU et al., 2012). Recentemente, Soares et al., (2014), desenvolveram um hidrogel a base de policaju e quitosana sem a necessidade de modificação química na estrutura dos polissacarídeos envolvidos, e o mesmo se mostrou um bom candidato a aplicação como curativo tópico de lesões cutâneas.

Outro excelente polissacarídeo capaz de interagir sinergicamente em misturas de polímeros, são as galactomananas. Estas têm apresentado resultados satisfatórios em interações sinérgicas com outros polissacarídeos como a κ-carragenana e a xantana, resultando numa melhora da qualidade do produto (PINHEIRO et al., 2011). No desenvolvimento de géis, a interação entre galactomananas e κ-carragenana tem melhorado suas qualidades reológicas e resistência térmica (MARTINS et al., 2012; PINHEIRO et al., 2011; ANDRADE et al., 2000; KASAPIS, AL-MARHOOBI & KHAN, 2000; TAKO et al., 1999) e isto têm despertado o interesse do campo biomédico devido ao seu potencial de aplicação como biomateriais inteligentes.

3.5 PELE

A pele é o revestimento exterior dos seres humanos e o maior órgão do corpo, abrangendo toda a superfície corporal. Ela possui uma estrutura complexa, que se encontra subdividida em três camadas (Figura 22) que, sob circunstâncias fisiológicas é intrinsecamente auto renovável, de modo que uma nova camada de pele se desenvolve a cada 2-3 semanas, enquanto as camadas mais velhas vão sendo afastadas para a superfície. As três camadas, de fora para dentro são: (i) epiderme: múltipla, sempre renovando camadas de queratinócitos; (ii) derme: separada da epiderme, na junção dermo-epidérmica (membrana basal); e (iii) hipoderme: composta principalmente de tecido adiposo e colágeno. Os anexos da pele, como folículos capilares, glândulas sebáceas e sudoríparas são numerosos e se misturaram ao longo dos vasos sanguíneos, terminações nervosas, e receptores de pressão e toque. Existem variações regionais em relação à espessura da pele, a distribuição dos anexos da pele, e densidade de melanócitos. (YILDIRIMER, THANH & SEIFALIAN, 2012).

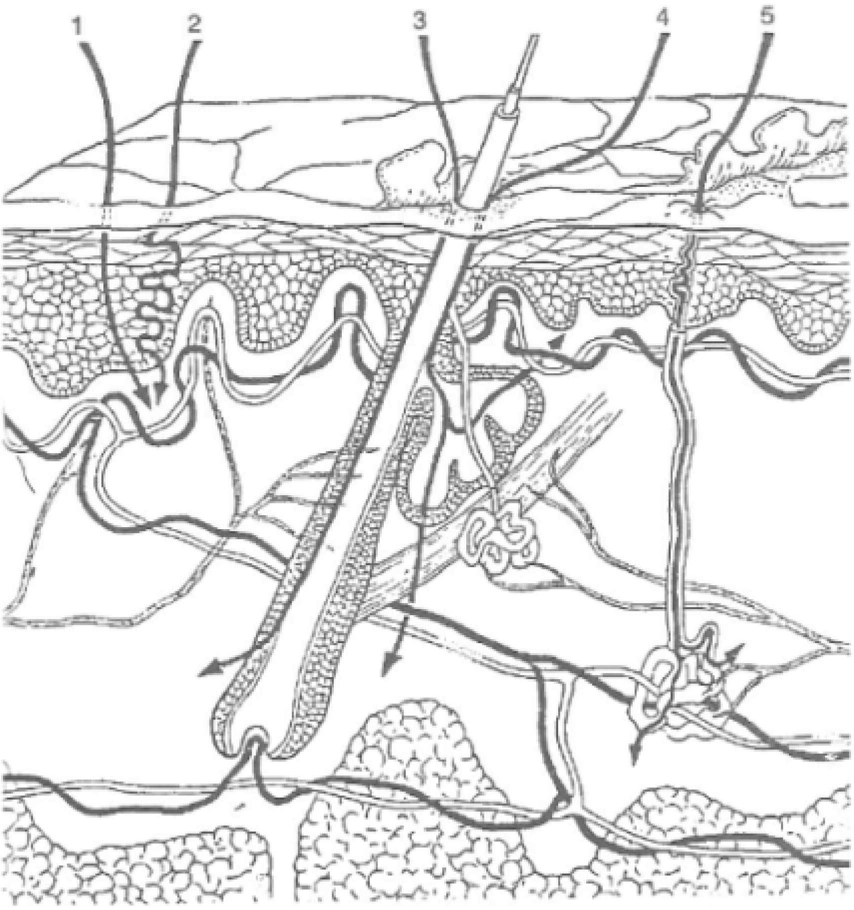
Figura 22 - Ilustração da pele humana que mostra as três camadas e os anexos que a constituem.



FONTE: YILDIRIMER, THANH & SEIFALIAN (2012).

A composição e a disposição das células e lipídios nas camadas mais externas da pele (extrato córneo - EC) criam um caminho tortuoso e fazem dela uma importante barreira que controla a saída de compostos e a água do organismo, assim como a entrada de compostos que são aplicados topicamente. Cinco diferentes rotas (Figura 23) podem ser utilizadas para a transposição do EC da pele: 1) A rota transcelular (entre os lipídios da EC) e 2) a intercelular (pelos lipídios da EC) acontece sem a participação de apêndices foliculares ou glandulares, presentes em maior ou menor quantidade, dependendo da região do corpo em estudo; as rotas transpendiculares acontecem através 3) dos folículos, 4) das glândulas sebáceas e 5) sudoríparas. Estes apêndices da pele representam apenas 0,1% da superfície cutânea, dessa forma, a transposição do EC é essencial para a penetração de compostos na pele (MOSER et al., 2001).

Figura 23 - Rotas para a penetração de compostos bioativos através do extrato córneo da pele. 1 – Rota transcelular, 2 – Rota intercelular, 3 – Rota folicular, 4 – Rota sebácea, 5 – Rota sudorípara.



FONTE: Martini (2005).

O inconveniente das rotas transcelular e intercelular está na alta seletividade em relação às substâncias que conseguem se difundir passivamente através do EC. A efetividade desta função do EC se verifica quando esta camada é retirada através da utilização de uma fita adesiva e percebe-se um forte aumento da permeabilidade de água e componentes hidrofílicos que anteriormente não apresentavam esta facilidade de difusão (ASBIL & MICHNIAK, 2000).

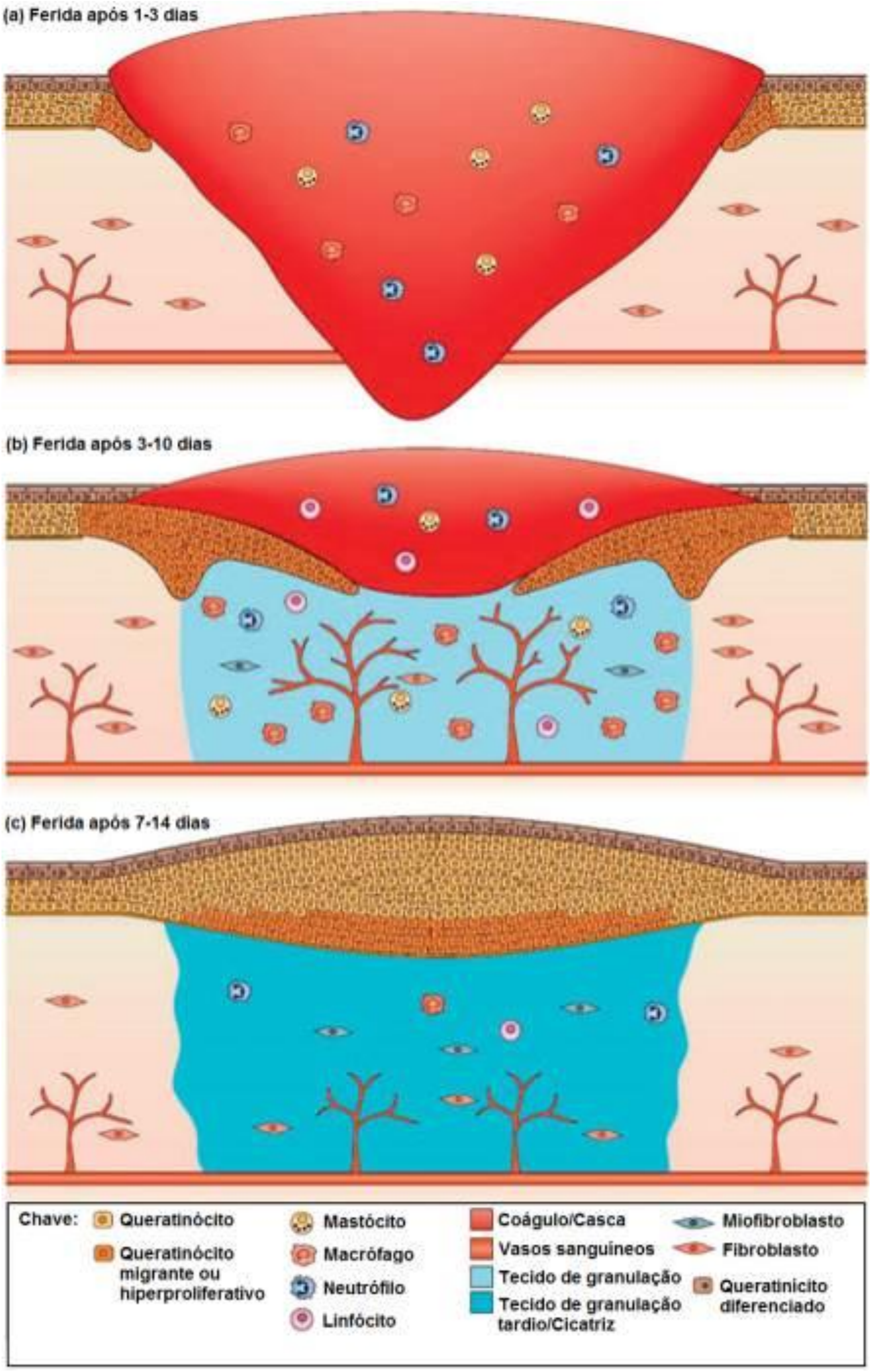
Uma vez que o transporte ocorre por difusão, a atuação do EC como barreira é limitada pelo seu grau de hidratação. Portanto, um aumento no conteúdo hídrico da pele leva a um aumento na permeabilidade de substâncias aplicadas topicamente (GUTERRES, ALVES & POHLMANN, 2007; MORGANTI et al., 2001). O coeficiente de permeabilidade é influenciado pela hidrofobicidade e tamanho das partículas penetrantes, pela presença ou ausência de cargas elétricas e a outros fatores relacionados às características da área de aplicação. Substâncias polares atravessam preferencialmente dentro do domínio intracelular, enquanto substâncias lipofílicas atravessam o EC principalmente pela rota intercelular (MORGANTI et al., 2001).

A pele funciona principalmente como uma interface protetora, protegendo fisicamente órgãos internos e tecidos contra agressões externas. Uma vez que a barreira externa é violada, os mecanismos de resposta protetora inata desencadeiam uma cascata de sinalização celular para limitar a dor, controlar a infecção e acelerar a cicatrização de feridas, naturalmente, em última análise, a criação de uma cicatriz. No entanto, extensas feridas, tais como aquelas associadas com queimaduras, raramente se curam espontaneamente e, portanto, necessitam de um meio externo de proteção, seja permanente ou temporário, para estimular não só a cicatrização da ferida, como também a auto regeneração da cicatriz. Convenções atuais sustentam que a construção de pele pela engenharia de tecidos deve se parecer com a pele nativa tanto anatomicamente quanto funcionalmente (YILDIRIMER, THANH & SEIFALIAN, 2012).

3.5.1 Processo de Cicatrização

As feridas são definidas como quebras na continuidade da estrutura da pele, normalmente resultantes de trauma físico e que conduzem à perda temporária ou terminais da função. A cicatrização é um processo dinâmico e complexo que resulta na restauração anatômica e continuidade da função da pele (Figura 24). Como desencadeante da cicatrização, ocorre a perda tecidual, a partir da qual o fisiologismo volta-se completamente para o reparo de um evento danoso ao organismo (MANDELBAUM, DI SANTIS & MANDELBAUM, 2003).

Figura 24 - Esquema do processo de cicatrização normal de feridas, incorporando várias moléculas de sinalização celular.



FONTE: SCHÄFER & WERNER (2008).

O processo cicatricial é constituído por quatro fases distintas, as quais se sobrepõem, mas que no fim dependem de eventos orquestrados de sinalização de células complexas (YILDIRIMER, THANH & SEIFALIAN, 2012):

1) Hemostasia – É provocada pós-lesão por plaquetas dentro do leito da ferida. Estas interagem com a matriz extracelular ativando a cascata de coagulação. Então o coágulo de sangue resultante fornece uma plataforma para a migração celular, dando inicio ao processo inflamatório.

2) Inflamação - É provocada por fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e fatores de crescimento transformante β (TGF-β) liberado pelas plaquetas. Estes sinalizam neutrófilos e monócitos, que são recrutados para fagocitar materiais estranhos (patógenos) no leito da ferida. Estes fatores ainda ativam os macrófagos que expressam fatores de estimulação de colônias-1 (CSF-1), fatores de necrose tumoral-β (TNF-β) e PDGF que atuam como agentes quimiotáticos para os fibroblastos, iniciando assim a proliferação celular.

3) Proliferação – Os fatores de crescimento celular PDGF, TGF-β, e moléculas da matriz extracelular induzem a proliferação de fibroblastos, promovendo a deposição de uma nova matriz. Além disso, ocorre a expressão dos receptores de integrinas que promovem o reconhecimento e aderência celular.

4) Remodelação – Com a deposição de uma nova matriz começa a ocorrer a reticulação de moléculas de colágeno. A partir disso, enzimas derivadas dos fibroblastos incluindo colagenases, fatores ativadores de plasminogênio e gelatinases, abrem caminhos através da nova matriz extracelular, facilitando o movimento celular. Finalizando, o tecido de granulação é então substituído por uma cicatriz acelular e avascular.

Na engenharia de tecidos, o propósito maior para curativos e enxertos de pele é permitir a completa e natural, embora acelerada, regeneração de feridas. Uma matriz de apoio tridimensional deve servir como modelo para a regeneração do tecido, evitando, simultaneamente, a contração do leito da ferida durante os primeiros estágios de cura (CHEVALLAY & HERBAGE, 2000). Esta matriz, ou suporte, deve ainda servir como uma plataforma para a localização, adesão e diferenciação celular, bem como orientar o desenvolvimento de novos tecidos funcionais (KIM & MOONEY, 1998).

Entre os diferentes tipos de matrizes/curativos para feridas cutâneas produzidos até agora, os hidrogéis, devido às suas propriedades intrínsecas, são os que melhor mimetizam a matriz extracelular e têm o potencial para dirigir a migração, adesão e crescimento celular durante a regeneração do tecido, eventos que são cruciais para a regeneração da pele (NICODEMUS & BRYANT, 2008; YU & DING, 2008; LAKES, 2007). Quando aplicadas no local da ferida, os hidrogéis promovem uma cura úmida e arrefecem a superfície da ferida, o que pode levar a uma redução relevante da dor e, portanto, possuem uma elevada aceitação pelo paciente (BOATENG et al., 2008; BALAKRISHNAN et al., 2005).

Alguns hidrogéis têm a particularidade de gelificar dentro da cavidade do tecido ou órgão desejado como resultado das interações entre seus polímeros formadores. Tais sistemas de formação *in situ*, possuem vantagens, pois fluem livremente como líquidos injetáveis antes da administração e gelificam sob condições fisiológicas (MIGUEL et al., 2014). Outros tipos de hidrogéis a base de polissacarídeos naturais também têm sido aplicados como curativos tópicos, e muitos deles são utilizados para mobilizar compostos bioativos que aceram o processo cicatricial (WANG et al., 2014; MIGUEL et al., 2014; HU et al., 2012).

3.5.2 Bromelina no Processo de Cicatrização

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas ou proteases encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é o mais conhecido. As enzimas proteolíticas encontradas nos talos recebem o nome de bromelina do talo e tem o número sistemático da Comissão sobre Enzimas da União Internacional de Bioquímica EC 3.4.22.4, e as encontradas no fruto são chamadas de bromelina do fruto ou ainda, bromelina e tem o número sistemático EC 3.4.22.5 (MURACHI, 1976).

A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (WU et al., 2012; CHOBOTOVA, VERNALLIS & MAJID, 2010). Estas enzimas desempenham importante função na remodelação proteolítica da matriz extracelular em vários processos fisiológicos, incluindo a morfogênese tecidual, reparação tecidual, angiogênese e remodelação do tecido, reduzindo hematomas, inchaço, dor e o tempo de cicatrização (ROSENBERG et al., 2012; RAHM & LABOVITZ, 2007).

O uso de bromelina em acelerar o processo de cicatrização têm sido bastante vantajoso devido à sua ação direta sobre os mediadores inflamatórios (Tabela 5) que são liberados em resposta a lesão (KELLY & N.D., 1996).

Tabela 5 - Impacto da bromelina nos mediadores da inflamação aguda.

Mediador	Ação	Efeito da Bromelina
Bradicininca	derrame vascular, dor	diminui
Tromboxano A2	vasoconstricção, agregação plaquetária	diminui
Prostaglandina E2	vasodilatação	ligeira diminuição
Prostaciclina 2	vasodilatação	pode aumentar
	inibição da agregação plaquetária	pode aumentar
Interleucina I	adesão de leucócitos,	aumenta
Protaciclina 2 e Fator Ativador de Plaquetas	síntese	aumenta
	resposta de fase aguda	induzida
	proliferação de fibroblastos	aumenta
	síntese de colagenase	aumenta
	formação de colágeno	aumenta
Fator de Necrose Tumoral	adesão de leucócitos,	aumenta
Protaciclina 2 e Fator Ativador de Plaquetas	síntese	aumenta
	resposta de fase aguda	induzida
	proliferação de fibroblastos	aumenta
	síntese de colagenase	aumenta
	formação de colágeno	aumenta

Fonte: KELLY & N.D. (1996).

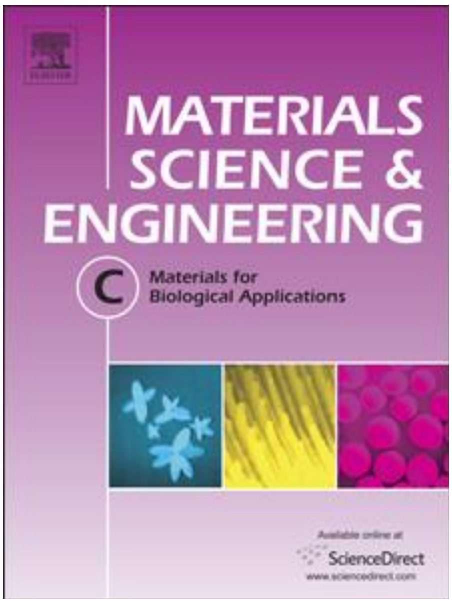
Durante o processo hemostático da cicatrização, foi verificado que a bromelina atua reduzindo o fator X e a protrombina, ambos são necessários para a ativação do fibrinogénio e sua conversão em fibrina através da via comum intrínseca e extrínseca da cascata de coagulação (TAUSSIG & BATKIN, 1988). Isto indica que a ação de bromelina é em parte um resultado da inibição da geração de bradicinina no local inflamatório através do esgotamento do sistema de calicreína plasmática, bem como redução da formação de fibrina por redução dos intermediários da cascata de coagulação. Essas ações resultam em redução significativa da dor e edema, assim como uma melhor circulação para o local lesionado (KELLY & N.D., 1996).

Após a formação do coágulo, a reparação dos vasos começa com a conversão do plasminogênio em plasmina, que, em seguida, atua para degradar a fibrina em componentes menores que podem ser removidos por monócitos e macrófagos. Nessa etapa, foi verificado que a bromelina estimula a conversão de plasminogênio em plasmina, resultando num aumento da fibrinólise. Isto minimiza a estase venosa, facilita a drenagem, aumenta a permeabilidade e restaura a continuidade do tecido em formação (TAUSSIG & BATKIN, 1988).

Considerando-se a potencialidade da bromelina no processo cicatricial, sua incorporação em hidrogéis facilitaria o uso tópico desta biomolécula. Além disso, a utilização de polissacarídeos como materia-prima renovável e barata para o preparo desse hidrogéis tornaria o produto final economicamente viável. Entretanto, para um novo biomaterial, é necessário que o mesmo seja completamente caracterizado para que suas características físico-químicas, propriedades mecânicas e biológicas atendam aos critérios de qualidade exigidos pela indústria.

4 RESULTADOS

ARTIGO I - ARTIGO PUBLICADO NO PERÍODICO MATERIAL SCIENCE AND ENGINEERING C



ISSN: 0928-4931

IMPACT FACTOR: 2.736

Development and characterization of hydrogels based on natural polysaccharides: Policaju and chitosan

Materials Science and Engineering C 42 (2014) 219–226

Contents lists available at ScienceDirect

Materials Science and Engineering C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msec

Development and characterization of hydrogels based on natural polysaccharides: Policaju and chitosan

Paulo A.G. Soares [a,b], Ana I. Bourbon [c], António A. Vicente [c], Cesar A.S. Andrade [a], Wilson Barros Jr. [d], Maria T.S. Correia [a], Adalberto Pessoa Jr. [e], Maria G. Carneiro-da-Cunha [a,b,*]

[a] Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil
[b] Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil
[c] Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho (UMINHO), Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal
[d] Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil
[e] Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), Av. Lineu Prestes, 580, Butantã, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

A R T I C L E I N F O

Article history:
Received 23 December 2013
Received in revised form 4 April 2014
Accepted 8 May 2014
Available online 15 May 2014

Keywords:
Chitosan
Hydrogel characterization
Policaju
Rheology

A B S T R A C T

The development of hydrogels based on natural polysaccharides was investigated by preparing mixtures of policaju/chitosan at weight ratios of 1:4 and 2:3. Utilizing dynamic light scattering (DLS) techniques for these mixtures, an increase on the hydrodynamic particle radius was observed varying their pH from 3.0 to 12.0. Furthermore, a reduction of ζ-potential was also observed for the same pH interval. Following rounds of drying/hydration cycles at a specific pH value, hydrogel matrices were formed. The pore size distribution of these formed hydrogels was examined using scanning electron microscopy. Further FT-IR analyses confirmed a physical interaction between the polysaccharides policaju and chitosan. Swelling experiments revealed water uptake values, after 24 h of immersion in water, close to 270% for 1:4, and 320% for 2:3 hydrogels. Finally, rheological measurements were then conducted in order to confirm hydrogel viscoelastic features. These results indicate a promising road to biomaterials fabrication and biomedical applications.

1. Introduction

Hydrogels are three-dimensional polymeric networks capable of absorbing large quantities of water or biological fluids. Due to their ability to absorb water, hydrogels attract interest both from the fundamental aspects of the swelling process as from their potential applications. It is known that hydrogels can be used to preserve cells, nutrients, drugs or proteins [1–3]. Many examples of application can be found, such as in contact lenses and materials for separation of biomolecules or cells, matrices for the immobilization of cells and devices for the controlled release of bioactive compounds [4–6], engineering and tissue regeneration [7,8], diagnostic and biological adhesions regulation [9], just to name a few.

Hydrogels are based on hydrophilic polymers that, when crosslinked, do not dissolve. In an aqueous environment, the hydrophilic groups of the polymer chains are hydrated generating a "network" structure for the hydrogels. The term network involves chemical or physical crosslinkage between the active groups of the polymer. Rheologically, aqueous solutions of hydrophilic polymers typically exhibit a Newtonian behavior when present in low concentrations. However, since crosslinks among different polymer chains are introduced, the network thus obtained shows a viscoelastic and, sometimes, predominant elastic behavior [10]. In addition, hydrogels can be formulated in a variety of physical forms, including blends [11], micro- and nanoparticles [12], coatings and edible films [4].

Polysaccharides are natural long-chain polymers, linear or branched, nontoxic, biocompatible, biodegradable and of easy solubilization, and can form hydrogels or liquid crystals in solution [13]. Policaju is a polysaccharide obtained from *Anacardium occidentale* L. tree gum, abundant in the Northeast region of Brazil. Although the proportions of monosaccharides in the policaju vary depending on the seasonality of *A. occidentale* (source, age of the tree, time of exudation and climatic conditions), its chemical composition remains the same. It is an acidic polysaccharide complex with a molecular mass of 1.6×10^5 Da composed by a main chain of β-D-galactose (72%) connected by β-(1 → 3) linkage –O6 substituted, having terminal residues of α-D-glucose (14%), arabinose (4.6%), rhamnose (3.2%) and glucuronic acid (4.7%) [14,15]. A standard property of policaju is its solubility in water forming a low viscosity solution, as well as its precipitation in organic polar solvents, such as ethanol. Additionally to its nontoxic, hydrophilic, biocompatible and biodegradable behavior, policaju has been reported in very important biomedical applications such as anti-tumoral, antiparasitic, emulsifying and suspending properties in pharmaceutical formulations and cicatrizing agent [16–19].

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420 Recife, PE, Brazil. Tel.: +55 81 21268547; fax: +55 81 21268576.
E-mail address: mgcc@ufpe.br (M.G. Carneiro-da-Cunha).

http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.009
0928-4931/

Chitosan is a natural linear copolymer composed of glucosamine and *N*-acetylglucosamine units connected by β(1–4) linkages. This polysaccharide is a deacetylated form of chitin, an abundant polysaccharide present in crustacean shells, arthropods and some fungi, being commercially produced with molecular mass between 3.8×10^3 and 2.0×10^4 Da [20]. Due to its hydrophilicity, biocompatibility, biodegradability and low toxicity, chitosan has been used as a biomaterial with wound healing ability, hemostatic properties and antimicrobial activity [21,22].

Both policaju and chitosan have already been reported on the literature as potential materials to form hydrogels; however, most studies promote chemical/structural modifications with the addition of active radicals (carboxyl or amino groups), or through different types of chemical crosslinks and physical interactions [23–27]. Nevertheless the use of unmodified policaju, in combination with chitosan, as a potential material to form hydrogel has not been widely explored in the literature [15,27–29].

Industrially, there is a growing interest in the formulation of mixed polysaccharide systems, leading to final products having specific properties and possible cost advantages. The aim of this work was developing and characterizing hydrogels containing policaju and chitosan without further modification in their chemical structure, and to evaluate an efficient method of preparation of these hydrogels. The hydrogels were characterized regarding their morphologies, particle size distribution, ζ-potential, water uptake, structure and rheological behavior.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Polysaccharide from *A. occidentale* L. tree gum (collected from cashew in the South coast of Pernambuco, Brazil) was obtained according to the method described by Souza et al. [30] and termed policaju (POLI) (M_w ca. 1.1×10^5 g mol^{-1} [15]). Chitosan (CHI) with ≥75% deacetylation (M_w ca. 6.24×10^5 g mol^{-1}) was from Sigma (U.S.A.). All other reagents were of analytical grade and used without further purification.

2.2. Preparation of POLI–CHI hydrogels

The polysaccharide solutions of policaju (10% wt/vol) and chitosan (1% wt/vol) in 1.0% (vol/vol) lactic acid were previously prepared under agitation using a magnetic stirrer (500 rpm). Hydrogels with different proportions of policaju and chitosan (1:4, 2:3, 3:2 and 4:1, respectively) were prepared according to the modified method described by Abreu et al. [31]. Briefly, the chitosan pre-gel formation consisted of adding 0.1 mol/L $CaCl_2$ (1% vol/vol of the final volume of the desired mixture) to a beaker containing 1.0% (wt/vol) chitosan solution in 1.0% (vol/vol) lactic acid which was left stirring in a ultra-homogenizer (Ultra-Turrax, IKA, U.S.A) at 7000 rpm for 1 h. After that, the policaju solution 10.0% (wt/vol) in lactic acid 1.0% (vol/vol) was extruded through a syringe needle (27-gauge) at a flow rate of 1.0 mL/min and the mixtures, namely POLI–CHI pre-gel, were left stirring in Ultra-Turrax for 1 h. Then, the POLI–CHI pre-gel was set at different pH values (3.0–12.0) with 1.0 NaOH or HCl and stored under controlled temperature of 4 °C. The pre-gel of chitosan was used as control to observe any macro and microscopic change on the hydrogels obtained with the addition of policaju.

The different POLI–CHI pre-gels and chitosan pre-gel (blank) were distributed by glass Petri dishes (25 mL) and dried at 40 ºC for 16 h. The thin film obtained was swollen with 5 mL of distilled water and dried again at 40 ºC for 16 h and, from now on termed POLI–CHI hydrogel and chitosan hydrogel. This procedure contributes with the polymerization and activation of the matrix of the hydrogels for water uptake.

2.3. Hydrogel characterization

2.3.1. Dynamic light scattering (DLS) and ζ-potential

Dynamic light scattering (DLS) and ζ-potential (ζ) measurements were conducted on a ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, U.K.) for chitosan solution, policaju solution, and POLI–CHI pre-gel with different proportions of policaju/chitosan. The DLS cumulants analysis (30 scans) provides the characterization of a sample through the apparent *Z*-average hydrodynamic radius (*Rh*) for the particle size (μm) and polydispersity index (PDI), determined from the intensity of scattered light at 25 °C and a fixed scattering angle of 90°. The ζ-potential values were calculated using the Smoluchowski equation [32]. The measuring of the particle size was carried out in triplicate with samples analyzed in a period of 144 h, with intervals at 48 h for each analysis, in order to evaluate particle size distribution.

2.3.2. Water uptake

The effect of ionic strength and pH of the immersion solutions on water uptake (WU) capacity of the hydrogels was determined according to Paula et al. [33]. For the ionic strength studies hydrogel samples (ca. 1.0 g, each) were placed in a separate beaker containing NaCl (conc. 0.000, 0.056, 0.084 and 0.173 M). For the pH investigation, hydrogel samples (ca. 1.0 g, each) were poured in 200 mM buffered aqueous solutions of sodium citrate with pH 3.0 and 5.0; of sodium phosphate with pH 7.0 and 8.0, of Tris–HCl with pH 9.0, and of sodium carbonate with pH 11.0. After reaching equilibrium (over 48 h) the hydrogels were accurately weighed.

The WU of the different hydrogels was determined at temperature of 25 °C over the 48 h with the following equation:

$$\mathrm{WU}\ (\%) = \left[\frac{W_W - W_D}{W_D}\right] \times 100 \qquad (1)$$

where W_W is the weight of swollen hydrogel in water at each time and W_D is the weight of the dried hydrogel. Three samples of hydrogel were used for each measurement.

2.3.3. Scanning electron microscopy (SEM)

The SEM surface scans of the POLI–CHI pre-gels were conducted on a scanning electron microscope Quanta 200 FEG (FEI, USA) at an accelerating voltage of 10 kV under vacuum conditions. The samples were prepared onto coverslips attached to a support coated with a thin film of chromium and carbon to prevent the accumulation of static electric charge on the surface during electron irradiation and to avoid scanning faults and other image artefacts. The coverslips were dried naturally at room temperature (25 °C). For each sample internal matrix structure analysis, a cross-section of the swollen POLI–CHI hydrogels was lyophilized utilizing the cryofracture method.

2.3.4. FT-IR spectroscopy

FT-IR spectra of POLI–CHI pre-gels were taken on a spectrometer FT-IR Vertex 70 (Bruker, USA) in the range from 4000 to 450 cm^{-1}. Powdered samples were prepared with KBr to make pellets. To achieve a 2-cm^{-1} resolution, 128 scans were made in each spectrum.

2.3.5. Rheological measurements—frequency sweeps, flow curves and temperature stability

All rheological measurements were carried out according to Pinheiro et al. [34] using a rheometer MCR301 (Anton-Paar, Austria). Initially, the experiments were conducted with the POLI–CHI pre-gels and a chitosan pre-gel. Afterward the tests were conducted in POLI–CHI and chitosan hydrogels. The measurements were obtained, in triplicate for each sample, in a parallel plate geometry (diameter: 25 mm) cell with a gap between plates of 1 mm. In order to determine the appropriate strain for linear viscoelastic regime, preliminary strain sweeps were conducted at different frequencies (0.1, 1.0 and 10.0 Hz) for variable strains ranging from 0.1% to 10.0%. Frequency sweeps were carried out at 25 °C, in the 0.1–100 Hz range within the linear viscoelastic region. Moreover, the POLI–CHI hydrogels and the chitosan pre-gel were tested for temperature stability at oscillatory mode (frequency = 1.0 Hz) for a range of temperature from 0 to 70 °C, at a rate of 5 °C/min.

2.4. Statistical analysis

All results were expressed as mean ± standard deviation, and analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a multi-parametric Tukey's post hoc test in GraphPrism® (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Statistical significance was established at $p < 0.01$.

3. Results and discussion

Different ratios of 10% (wt/vol) policaju/1% (wt/vol) chitosan (1:4, 2:3, 3:2, 4:1, respectively) were tested to obtain hydrogels, however the policaju/chitosan 3:2 and 4:1 ratios did not formed hydrogels. Probably, due to higher content of policaju and its high solubility in water, these proportions did not lead the ormation of thin films of hydrogels capable of absorbing water without dissolving. In view of these results, all the experiments were conducted only for the policaju/chitosan 1:4 and 2:3 ratios.

3.1. Hydrogel characterization

3.1.1. Dynamic light scattering (DLS) and ζ-potential measurements

The influence of pH (3.0–12.0) on the ζ-potential (mV) and particle size (μm) was evaluated by DLS for policaju (10% wt/vol) and chitosan (1% wt/vol) solutions and POLI–CHI pre-gels (1:4 and 2:3). In a range of pH 3.0–12.0, the ζ-potential of policaju solutions showed values between +5.5 and −1.8 mV, considered a neutral range, which means that the carboxyl group content of 6.3% [14] of this polysaccharide was inefficient to present a negative charge (Fig. 1A). The polysaccharides may be constituted either by polycations or by polyanions, depending on their functional group, and may also be neutral, which is the case of different types of polysaccharides with a higher content of mannose and galactose units, with ζ-potential values between −13.7 and −2.1 mV [35].

Chitosan solutions presented positive ζ-potential values, ranging between +42.8 and +1.65 mV when the pH increased from 3.0 to12.0 and this can be explained because the chitosan is a polycation with a p*K*a of about 6.50 and has amino groups which can easily be positively charged [36]. These results are in agreement with the ζ-potential values obtained by Yu et al. [37] and Carneiro-da-Cunha et al. [35], which observed a reduction of ζ-potential of chitosan solutions, in a range of +60.0 and −0.1 mV, with the increase of the pH value from 2.5 to 11.0. The ζ-potential values obtained by these authors are higher than those obtained in the present work. This is possibly due to the higher deacetylation degree of the chitosan used by those authors, when compared to the one used in the work reported here. In fact, it is known that the higher the deacetylation degree, the higher the content of amine groups positively charged on the surface of the chitosan particles.

All POLI–CHI pre-gels (1:4 and 2:3) showed a decrease of ζ-potential from +37.2 to −3.2 mV with 1:4 ratio and from +18.1 to −0.4 mV with 2:3 ratio, with the pH increase. The relative charge beyond the hydrodynamically stagnant layer of POLI–CHI pre-gels (1:4 and 2:3) showed that there were significant differences in the resulting ζ-potential with the increase of policaju content (Fig. 1A).

As a general rule, suspensions with ζ-potential above 60 mV (absolute value) show excellent stability: above 30 mV, suspensions are physically stable; below 20 mV, they are of limited stability; and below 5 mV, they undergo pronounced aggregation [38]. The ζ-potential values obtained for POLI–CHI pre-gels at pH 5.0 are in the limit of physical stability (Table 1), showing positive values of ζ-potential (+13.30 ± 0.62 mV)

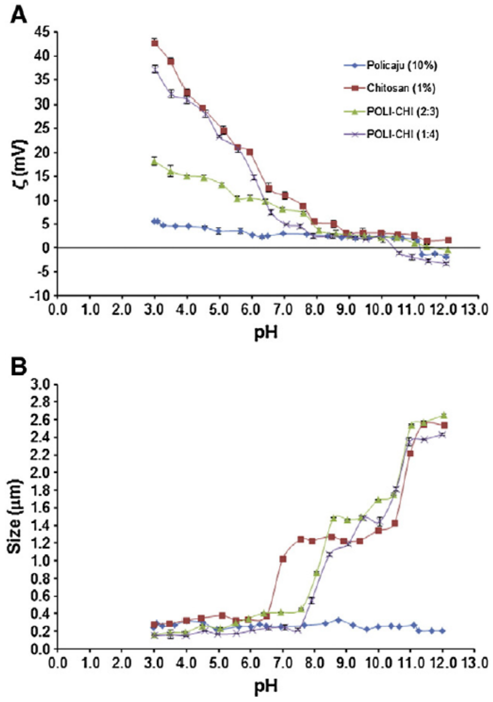


Fig. 1. (A) The pH dependent ζ-potential of policaju, chitosan and POLI–CHI pre-gels 1:4 and 2:3. (B) DLS measurements of policaju, chitosan and POLI–CHI pre-gels 1:4 and 2:3. Each data point is the average of three determinations and error bars show the standard deviation.

for 2:3 POLI–CHI pre-gel with high policaju content and also positive for 1:4 POLI–CHI pre-gel with low policaju content (+23.27 ± 0.25 mV). The pre-gels with higher ζ-potential values have a higher charge density of the amino groups on the surface and are stable, as in the case of pre-gel obtained with higher chitosan content (1:4). These changes on chitosan charge, and on reduction of POLI–CHI pre-gels charge were similar to those observed in alginate and chitosan pre-gels reported by Abreu et al. [31] and in nanogels prepared by electrostatic self-assembly of chitosan and ovalbumin reported by Yu et al. [37]. Of note, the association of chitosan with other natural or synthetic polymers is a convenient and effective way to improve its physical properties for practical applications [39,40]. Since chitosan and policaju are polyelectrolytes, it is possible to obtain ionic complexes through hydrogen bonding or electrostatic interactions [41], resulting in interpenetrating polymer network. Multivalent cations, such as Ca^{2+}, can be coordinated with carboxylate groups present in the hydrogel [42] and associated with –OH groups present in the polysaccharide [43], which results in the formation of polyanionic-cationic complexes resembling a stabilized isotropic gel network.

Table 1
DLS measurements of the policaju, chitosan and POLI–CHI pre-gels 1:4 and 2:3 at pH 5.0.

Solutions	ζ (mV)	Size (μm)	PDI
Policaju 10%	3.54 ± 0.61	0.224 ± 0.004	0.578 ± 0.017
Chitosan 1%	24.57 ± 0.83	0.378 ± 0.006	0.500 ± 0.056
POLI–CHI (1:4)	23.27 ± 0.25	0.168 ± 0.009	0.257 ± 0.027
POLI–CHI (2:3)	13.30 ± 0.62	0.233 ± 0.008	0.374 ± 0.007

Fig. 1B shows that the particle size of policaju solutions was almost constant at all pH values (3.0–12.0), whereas chitosan solutions showed a slight increase at the pH range of 3.0–5.0, remaining constant from pH 5.0 to 6.5. When pH values exceeded 6.5, the precipitation occurred immediately due to the aggregation behavior of the particles of chitosan observed through the formation of turbidity and confirmed by increase of the particles sizes.

Aggregation of polysaccharide solutions can be related with the charge of the polysaccharide, where different charges will induce different behaviors [35]. This phenomenon of aggregation in chitosan solutions at neutral and basic pH values is related to the presence of hydroxyl and amino groups in chitosan's structure [44]. All the POLI–CHI pre-gels with 1:4 and 2:3 ratio showed a slow increase of particles size in the pH range of 3.0–7.5, from 0.158 to 0.217 μm and from 0.149 to 0.455 μm, respectively, while at pH 7.5 the particle size of pre-gel 2:3 ratio was twice of that found for the pre-gel 1:4 ratio. For pH values above 7.5, the charges and the solubility of chitosan (p*K*a ≤ 6.5) decrease rapidly, preventing the formation of dispersible pre-gels and leading to precipitates, confirmed by the turbidity of the material in the tubes and DLS measurements.

At pH values ≤5.0 the particle size of the pre-gels was lesser or equal to the particle size of the constituents of the polysaccharide solutions (Table 1). This may have been generated by the ultra-homogenization process since the pre-gels undergo a physical extrusion in the Ultra-Turrax, thus reducing particle size. The use of ultra-homogenization process has been reported to reduce particle size of macromolecular solutions [45]. Information concerning size homogeneity of the particles within a sample is provided by DLS measurements in terms of polydispersity index (PDI).

The PDI describes the deviation of the measured autocorrelation function from that of a dispersion of monodisperse spheres with the same diameter. PDI values greater than 0.5 indicate a very broad particle-size distribution which is probably not suitable for DLS evaluation [46,47]. Up to pH 5.0, lower PDI values were obtained for the POLI–CHI pre-gels (1:4 and 2:3), suggesting that there is a reduced dispersion of average particle size for each pre-gel (Table 1). Therefore, in view of the results obtained for ζ-potential and particle size, pH 5.0 was chosen in this work to produce stable POLI–CHI hydrogels.

3.1.2. Water uptake

According to the method describe before, POLI–CHI pre-gels were used to obtain POLI–CHI hydrogels, and the swelling rate of POLI–CHI (1:4 and 2:3) and chitosan hydrogels was investigated by water uptake (WU) capacity (Fig. 2). Chitosan hydrogel swelled substantially over the course of the first 2 h when reached saturation and remained constant. In contrast, POLI–CHI hydrogels reached saturation with 24 h of immersion in water and remained constant until the final of the experiment (48 h). POLI–CHI hydrogels 1:4 and 2:3 ratios swelled up to 270% and 320%, i.e. it absorbed a mass of water originating a hydrogel with 3.7 and 4.2 times its dry weight, respectively. These results show that higher the policaju content, more cross-linked is the hydrogel. Furthermore, it was observed that POLI–CHI hydrogels 1:4 or 2:3 demonstrated to be extremely soft due to the high absorption of water.

No statistically significant differences in the WU values were found for the POLI–CHI hydrogels with 48 h of immersion in water (Fig. 2A) when compared to the corresponding values after 24 h of immersion in water (270% and 320% for 1:4 and 2:3 ratios, respectively).

The effect of ionic strength and pH of immersion solution on the water uptake capacity (WU) of the hydrogels was also evaluated. The WU was dependent on the ionic strength and pH of immersion solution. Regarding the ionic strength, an increase of WU capacity was observed with the increase of ionic strength (NaCl 0.000, 0.056, 0.084 and 0.173 M); besides there was no significant difference observed for POLI–CHI hydrogel 2:3 ratio. The WU maximum values of the POLI–CHI 1:4 and 2:3 ratios were 295% and 330%, respectively, with 48 h of immersion in the 0.173 M NaCl solution (Fig. 2B). The pH of the aqueous solution was varied between 3.0 and 11.0, using different buffered systems according to their p*K*a value (Fig. 2C). The results showed a maximum value of WU for both POLI–CHI hydrogels 1:4 and 2:3 ratios at pH 3.0 (300% and 380%, respectively), decreasing with the increasing of

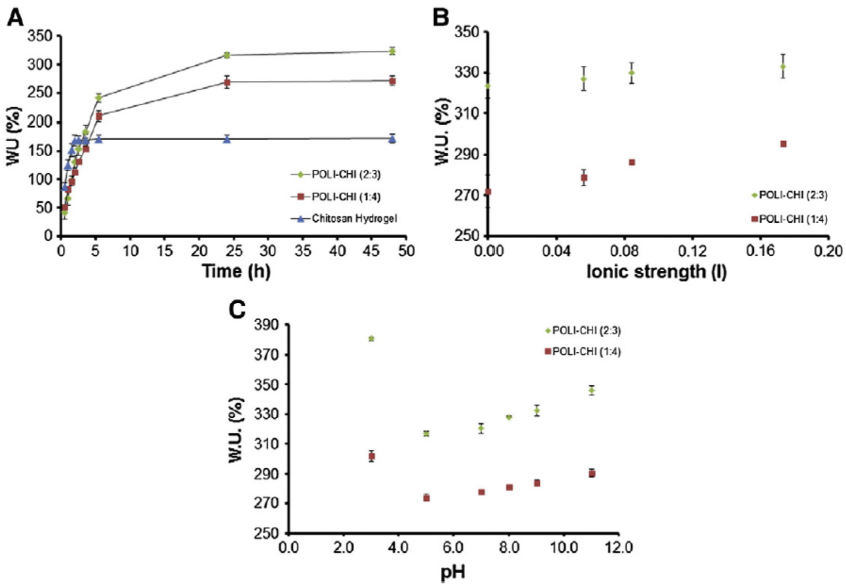


Fig. 2. (A) Water uptake by the POLI–CHI hydrogels 1:4 and 2:3 and chitosan hydrogel at pH 5.0 for 48 h in immersion of water. (B) Ionic strength effect on water uptake capacity by POLI–CHI hydrogels 1:4 and 2:3. (C) pH effect on water uptake capacity by POLI–CHI hydrogels 1:4 and 2:3. Each data point is an average of three experiments and the error bars show the standard deviation.

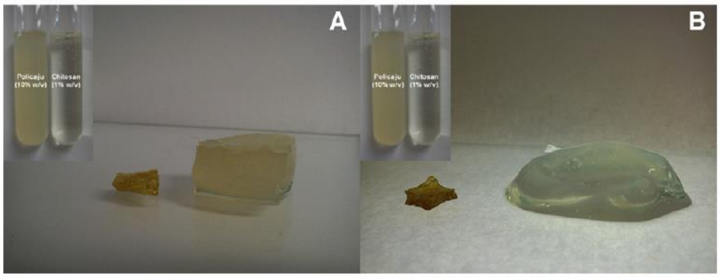


Fig. 3. Dry and swollen POLI–CHI hydrogels after a period of 48 h. (A) 1:4. (B) 2:3. Insert shows polysaccharide solutions of 10% (wt/vol) policaju and 1% (wt/vol) chitosan.

pH from 3.0 to 5.0. In an interval pH range of 5.0–11.0, an increase on WU capacity reaching values of 285% and 340% at pH 11.0 for POLI–CHI hydrogels 1:4 and 2:3, respectively, was verified. The maxima in WU capacity could be explained by the state of ionization of the main chemical groups in the mixtures; the groups responsible for maintaining the chain expansion and elongation: at the pH 3.0 maximum, the chitosan (NH^{+3}) group, and at the pH 11.0 maximum the policaju (COO^{-}) group. Similar results were reported in swelling studies for chitosan/cashew gum physical gels [33].

Superabsorbent hydrogels based on mixtures of different polysaccharides, with high WU values have been also reported in the studies by Guilherme et al. [23] and Chang et al. [48] who managed WU values for hydrogels around 325% (acrylamide/cashew gum) and 100% (cellulose/carboxymethycellulose) of their dried weight, respectively. Fig. 3 shows POLI–CHI hydrogels 1:4 and 2:3 swollen with 48 h and the inserted picture shows the polysaccharide solutions of 10% (wt/vol) policaju and 1% (wt/vol) chitosan; the colors of dried POLI–CHI hydrogels 1:4 and 2:3 and swollen POLI–CHI hydrogel 1:4 are similar to the color of policaju solution. The POLI–CHI hydrogel 2:3 was brighter than the 1:4 hydrogel because of the higher content of water absorbed.

3.1.3. POLI–CHI hydrogels morphology

SEM results (Fig. 4) show a cross section in cryofracture of the matrix of POLI–CHI hydrogels 1:4 and 2:3. The hydrogel matrices of the samples exhibited a macroporous architecture with pore size distribution, being more uniform and smaller for hydrogel 1:4, with sizes of approximately 6 μm (Fig. 4A and B). This uniform pore distribution for hydrogel 1:4 agrees with PDI values shown in Table 1. It can be observed that an increased amount of policaju content led to changes in the morphology of POLI–CHI hydrogel; this is evident in the higher number of pores as well as in the asymmetrical pore size distribution observed for hydrogels 2:3, with pore sizes peaking at 72 μm (Fig. 4C and D).

This higher porosity distribution for hydrogel 2:3, agrees that this hydrogel leads to more swelling and lowers the stiffness in comparison

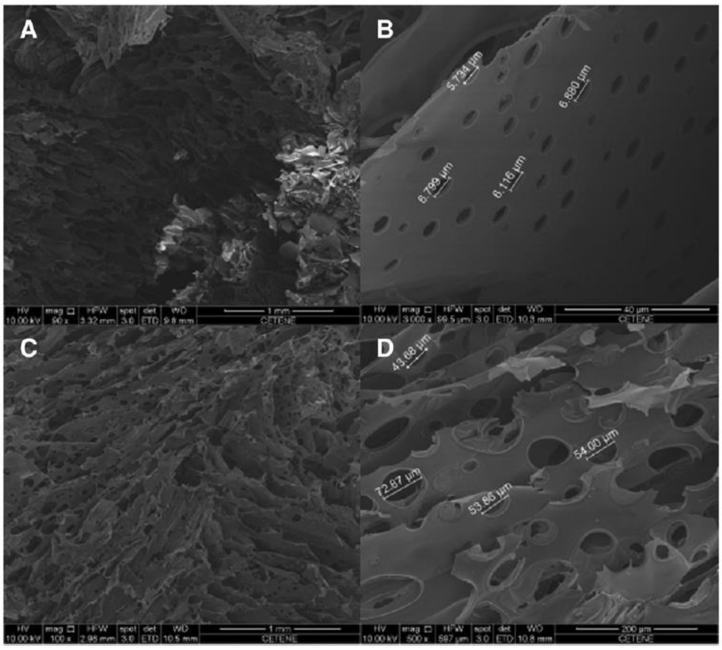


Fig. 4. SEM micrographs of cross-section in cryofracture of POLI–CHI hydrogels. (A and B) 1:4 (90× and 3000×, respectively). (C and D) 2:3 (100× and 500×, respectively).

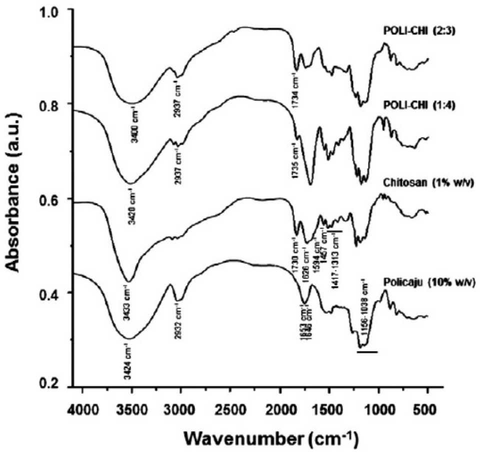


Fig. 5. FT-IR spectra of 10% (wt/vol) policaju, 1% (wt/vol) chitosan, and POLI–CHI pre-gels 1:4 and 2:3 at pH 5.0.

with the hydrogel 1:4. These results shown that increasing the policaju content in POLI–CHI formulation was capable of changing the matrix of hydrogels and add new characteristics which raised new possible biotechnological applications.

3.1.4. FT-IR analyses

The interaction between the polysaccharides can be observed through changes in the vibration modes of the main groups observed by infrared spectroscopy (Fig. 5). Chitosan of 1.0 % (wt/vol) shows a broad absorption at 3433 cm^{-1} from stretch vibrations of –OH and –NH_2 groups. Carbonyl groups (C = O) were detected at 1730 cm^{-1}. Their principal vibration modes are asymmetrical and symmetrical bending NH_3^+ (amide I and II) vibrations at 1628, 1594 and 1457 cm^{-1}. Other important stretching vibrations of –CH_2– from pyranosidic structures were observed at 1417–1313 cm^{-1} [28,29].

The weak band at 1653 cm^{-1} in the infrared spectroscopy of 10% (wt/vol) policaju was assigned to the C = O group from glucuronic acid, present at 6% levels in the original gum. A broad band at 3424 cm^{-1} due to the stretching vibration of O–H, a small peak at 2932 cm^{-1}, attributed to the –CH stretching vibration, and absorption at 1646 cm^{-1}, due to O–H scissor vibrations from bound water molecules were observed. Strong peaks at 1156–1038 cm^{-1} were also observed, due to stretching vibrations of C–O–C from glucosidic bonds and O–H bending from pyranosidic structures in agreement with the FT-IR of the nanoparticles [27] and beads [29] obtained by mixing of policaju and chitosan.

The POLI–CHI complex formation was evidenced by the sharpening of the bands from the two polysaccharides. Amine (—NH_2) and carboxyl (C = O) groups from chitosan and the –CH group from policaju were detected in POLI–CHI pre-gels (1:4 and 2:3); however, the bands were shifted, which demonstrate the presence of molecular interactions between these two polymers. Physical interactions as Van der Waals forces and hydrogen bonds may play an important role in this hydrogel composition, suggesting a physical hydrogel type. Ionic interactions can be discarded because of the absence of ionic groups in policaju structure

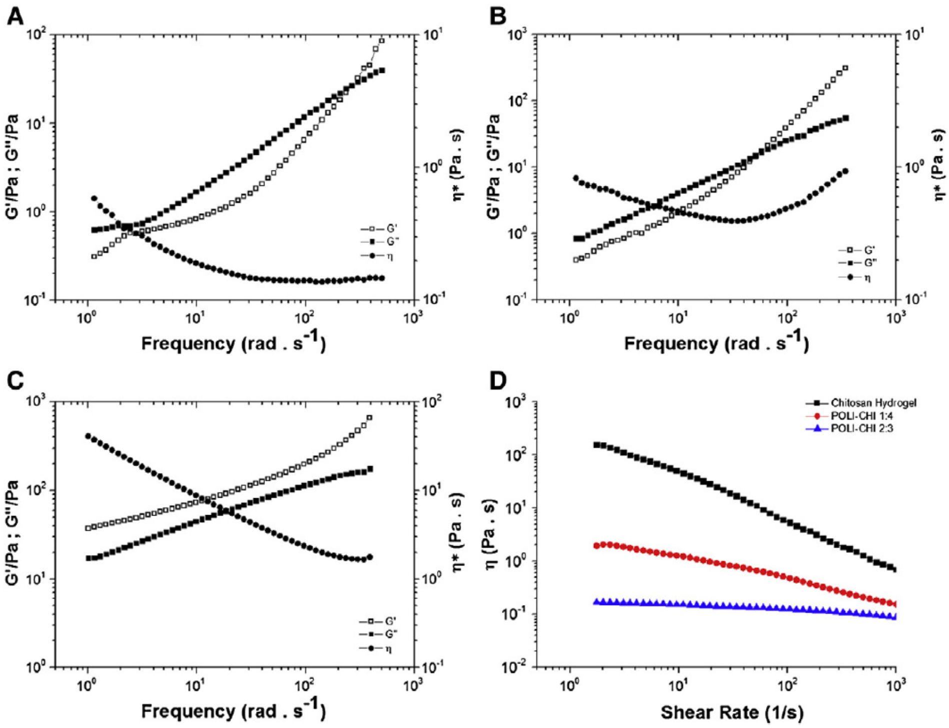


Fig. 6. Mechanical spectra of POLI–CHI mixtures and chitosan hydrogel, at 25 °C. (A) 2:3. (B) 1:4. (C) Chitosan hydrogel. (D) Apparent viscosity *versus* shear rate of 1:4 and 2:3 POLI–CHI mixtures and chitosan hydrogel.

available to interact with the amino groups of chitosan detected in the pre-gels spectra.

3.1.5. Dynamic shear properties

The rheological behavior of POLI–CHI (1:4 and 2:3) and chitosan pre-gels was evaluated. The rheometry of the mixed polysaccharide pre-gel solutions showed the typical liquid–solid behavior of macromolecular solutions: at low frequencies the viscous modulus, G" dominated over the elastic modulus, G′, i.e., the system showed liquid-like features. A crossover frequency for the two moduli was evident. After this value the elastic response prevailed. Furthermore, the cross-over frequency decreased as the policaju concentration decreased in the mixture.

In order to evaluate the gelation of the POLI–CHI hydrogel candidates, oscillatory dynamic measurements were carried out for the highest swollen hydrogels over a frequency range of 1–100 Hz. Fig. 6A–C shows mechanical spectra of POLI–CHI mixtures (1:4 and 2:3) and chitosan hydrogel. The chitosan hydrogel exhibited a predominant elastic behavior, with storage modulus (G′) greater than loss modulus (G"), for the entire frequency interval investigated; this behavior contrasts with the one observed for the pre-gel of chitosan (liquid-like behavior, results not shown).

The swollen POLI–CHI (1:4 and 2:3) hydrogel candidates showed typical viscoelastic behavior. Nevertheless, there was a reduction in the crossover frequency between the G′ and G" compared to the POLI–CHI pre-gels (results not shown), indicating that gelification partially occurred. It should be stressed that the hydrogel mixtures used were at the highest swelling ratios. Lower amounts of retained water should increase the elastic contribution from the polymeric structure.

POLI–CHI swollen hydrogels (1:4 and 2:3) showed an increase in the complex viscosity values with the increase in frequency, being this increase a function of the policaju content in the mixture (Fig. 6A and B). The higher the policaju content, the lower the complex viscosity values. This indicates that POLI–CHI hydrogel 1:4 has a higher interaction between the polysaccharides than POLI–CHI hydrogel 2:3. The role of policaju concentration is best seen in Fig. 6D, showing the magnitude of apparent viscosity versus shear rate for 1:4 and 2:3 POLI–CHI hydrogels and chitosan hydrogel.

During the preparation stage, it was found that temperature affects the physical structure of hydrogels. Fig. 7 shows mechanical spectra of POLI–CHI hydrogels and chitosan hydrogel, conducted in oscillatory mode, as a function of temperature (0–70 °C). For the POLI–CHI 2:3 hydrogel samples tested, G" was greater than G′, showing a steady reduction with an increase in temperature with no crossovers (Fig. 7A). Assuming no substantial evaporation had occurred, it was observed that at 62.7 °C for POLI–CHI 1:4 hydrogel (Fig. 7B) and 57.2 °C for chitosan hydrogel (Fig. 7C), G′ crossed over G″, indicating that an ultimate gelling structure has been reached. An increase in complex viscosity values was observed accordingly indicating a greater interaction of the polysaccharides involved and an increase in the organization of these hydrogel networks when compared to the POLI–CHI 2:3 hydrogel samples.

Since the hydrogels are highly swollen, the latter results could also be interpreted as due to variations in water content as a function of temperature.

4. Conclusion

Hydrogels of policaju and chitosan were obtained successfully using an ultra-homogenization process of direct injection and extrusion with an ULTRA-Turrax. At pH 5.0 it was possible to obtain stable polysaccharide solutions with low PDI values and small particles. The matrix structure of POLI–CHI hydrogels showed a network with pores of different sizes; networks more uniform for POLI–CHI 1:4 hydrogels than POLI–CHI 2:3 hydrogels. FT-IR analysis confirmed the existence of physical interactions between the polysaccharides involved and rheological measurements showed a decrease in complex viscosity with the increase of policaju content. Temperature seems to play an important

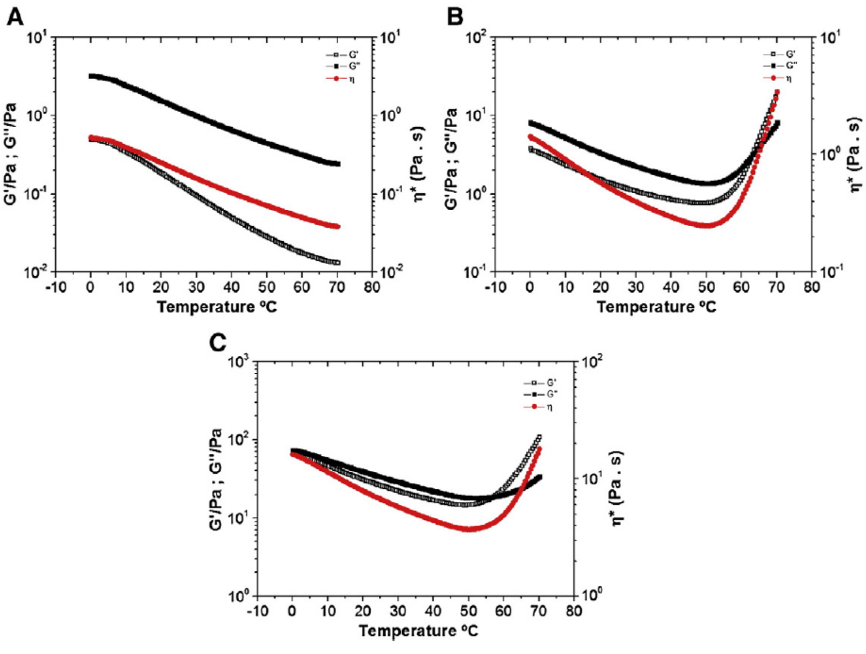


Fig. 7. Temperature influence in the hydrogels matrix: (A) 2:3, (B) 1:4, (C) chitosan hydrogel.

role in hydrogel formation. Above 57 °C it was possible to polymerize POLI–CHI hydrogels.

Dried POLI–CHI hydrogels swelled until 4.2-fold their initial weight. An increase of policaju content induced a higher water uptake; therefore this increase of policaju content also resulted in weaker hydrogels. The biological properties of polysaccharides involved and the features presented by POLI–CHI hydrogels make them attractive for applications in biotechnology, especially in biomedical, cosmetic and pharmaceutical industries. Finally, the uniform porosity for hydrogel 1:4 suggests that it might be suitable for biotechnological applications such as drug-controlled release. Conversely, the high swelling and fluid composition for hydrogel 2:3 suggest its possible use in cosmetic and medical industry as a topical gel.

Acknowledgments

Paulo A.G. Soares is a recipient of a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the author Ana I. Bourbon is a recipient of a fellowship from the Fundação para a Ciência e Tecnologia, POPH-QREN and FSE (FCT, Portugal) through grant SFRH/BD/73178/2010. Maria G. Carneiro-da-Cunha, Maria T.S. Correia, Cesar A.S. Andrade and Adalberto Pessoa Jr express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants. The authors are grateful to the Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) of the Ministério da Ciência e Tecnologia for technical assistance and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROCAD) for financial support.

References

[1] N.L. Delgadillo-Armendariz, N.A. Rangel-Vázquez, A.J. García-Castañón, Spectroscopy analysis of chitosan–glibenclamide hydrogels, Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 120 (2014) 524–528.
[2] Y. Luo, Z. Teng, X. Wang, Q. Wang, Development of carboxymethyl chitosan hydrogel beads in alcohol-aqueous binary solvent for nutrient delivery applications, Food Hydrocoll. 31 (2013) 332–339.
[3] J. Guo, Y. Jin, X. Yang, S. Yu, S. Yin, J. Qi, Computed microtomography and mechanical property analysis of soy protein porous hydrogel prepared by homogenizing and microbial transglutaminase cross-linking, Food Hydrocoll. 31 (2013) 220–226.
[4] G.R. Bardajee, Z. Hooshyar, One-pot synthesis of biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles/hydrogel based on salep: characterization and drug delivery, Carbohydr. Polym. 101 (2014) 741–751.
[5] E. Ruel-Gariépy, J.C. Leroux, In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems, Eur. J. Pharm. Biopharm. 58 (2004) 409–426.
[6] J.S. Varghese, N. Chellappa, N.N. Fathima, Gelatin–carrageenan hydrogels: role of pore size distribution on drug delivery process, Colloids Surf. B: Biointerfaces 113 (2014) 346–351.
[7] Ž. Jovanović, A. Radosavljević, Z. Kačarević-Popović, J. Stojkovska, A. Perić-Grujić, M. Ristić, I.Z. Matić, Z.D. Juranić, B. Obradovic, V. Mišković-Stanković, Bioreactor validation and biocompatibility of Ag/poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel nanocomposites, Colloids Surf. B: Biointerfaces 105 (2013) 230–235.
[8] M. Gajendiran, V. Gopi, V. Elangovan, R.V. Murali, S. Balasubramanian, Isoniazid loaded core shell nanoparticles derived from PLGA–PEG–PLGA tri-block copolymers: in vitro and in vivo drug release, Colloids Surf. B: Biointerfaces 104 (2013) 107–115.
[9] F. Wang, Z. Li, M. Khan, K. Tamama, P. Kuppusamy, W.R. Wagner, C.K. Sen, J. Guan, Injectable, rapid gelling and highly flexible hydrogel composites as growth factor and cell carriers, Acta Biomater. 6 (2010) 1978–1991.
[10] W.E. Hennink, C.F. van Nostrum, Novel crosslinking methods to design hydrogels, Adv. Drug Deliv. Rev. 54 (2002) 13–36.
[11] T.R. Hoare, D.S. Kohane, Hydrogels in drug delivery: progress and challenges, Polym. J. 49 (2008) 1993–2007.
[12] F. De Ciccoa, E. Reverchonb, R. Adamib, G. Auriemmaa, P. Russoa, E.C. Calabresea, A. Portaa, R.P. Aquinoa, P. Del Gaudioa, In situ forming antibacterial dextran blend hydrogel for wound dressing: SAA technology vs. spray drying, Carbohydr. Polym. 101 (2014) 1216–1224.
[13] R. Chandra, R. Rustgi, Biodegradable polymers, Prog. Polym. Sci. 23 (1998) 1273–1335.
[14] R.C.M. Paula, J.F. Rodrigues, Composition and rheological properties of cashew trees gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L, Carbohydr. Polym. 26 (1995) 177–181.
[15] J.S. Maciel, H.C.B. Paula, R.C.M. de Paula, Chitosan/Carboxymethyl cashew gum polyelectrolyte complex: synthesis and thermal stability, Eur. Polym. J. 41 (2005) 2726–2733.
[16] G.V. Schirato, F.M.F. Monteiro, F.O. Silva, J.L. Lima-Filho, A.M.A. Carneiro-Leão, A.L.F. Porto, O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas, Cienc. Rural 36 (2006) 149–154 (Santa Maria).
[17] F.M.F. Monteiro, G.M.M. Silva, J.B.R. Silva, C.S. Porto, L.B. Carvalho Jr., J.L. Lima-Filho, A.M.A. Carneiro-Leão, M.G. Carneiro-da-Cunha, A.L.F. Porto, Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing, Process Biochem. 42 (2007) 884–888.
[18] A. Kumar, A. Moin, R. Shruthi, A. Ahmed, H.G. Shivakumar, Cashew gum a versatile hydrophyllic polymer: a review, Curr. Drug Ther. 7 (2012) 2–12.
[19] Y. Luo, Q. Wangs, Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery, Int. J. Biol. Macromol. 64 (2014) 353–367.
[20] M. Rinaudo, Chitin and chitosan: properties and applications, Prog. Polym. Sci. 31 (2006) 603–632.
[21] K. Madhumathi, K.T. Shalumon, V.V. Divya Rani, H. Tamura, T. Furuike, N. Selvamurugan, S.V. Nair, R. Jayakumar, Wet chemical synthesis of chitosan hydrogel–hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications, Int. J. Biol. Macromol. 45 (2009) 12–15.
[22] F. Chicatun, N. Muja, V. Serpooshan, T.M. Quinn, S.N. Nazhat, Effect of chitosan incorporation on the consolidation process of highly hydrated collagen hydrogel scaffolds, Soft Matter 9 (2013) 10811–10821.
[23] M.R. Guilherme, A.V. Reisa, S.H. Takahashia, A.F. Rubira, J.P.A. Feitosa, E.C. Muniz, Synthesis of a novel superabsorbent hydrogel by copolymerization of acrylamide and cashew gum modified with glycidyl methacrylate, Carbohydr. Polym. 61 (2005) 464–471.
[24] S.R. Van Tomme, G. Storm, W.E. Hennink, *In situ* gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications, Int. J. Pharm. 355 (2008) 1–18.
[25] R.A.A. Muzzarelli, Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids, Carbohydr. Polym. 77 (2009) 1–9.
[26] N.G. Kandile, M.I. Mohamed, H.T. Zaky, A.S. Nasr, E.M. Abdel-Bary, Synthesis and properties of chitosan hydrogels modified with heterocycles, Carbohydr. Polym. 75 (2009) 580–585.
[27] F.O.M.S. Abreu, E.F. Oliveira, H.C.B. Paula, R.C.M. de Paula, Chitosan/Cashew gum nanogels for essential oil encapsulation, Carbohydr. Polym. 89 (2012) 1277–1282.
[28] H.C.B. Paula, R.C.M. de Paula, S.K.F. Bezerra, Swelling and release kinetics of larvicide-containing chitosan/cashew gum beads, J. Appl. Polym. Sci. 102 (2006) 395–400.
[29] H.C.B. Paula, F.M. Sombra, R.F. Cavalcante, F.O.M.S. Abreu, R.C.M. de Paula, Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with Lippia sidoides essential oil, Mater. Sci. Eng. C 31 (2011) 173–178.
[30] M.P. Souza, M.A. Cerqueira, B.W.S. Souza, J.A. Teixeira, A.L.F. Porto, A.A. Vicente, M.G. Carneiro-da-Cunha, Polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. tree gum (Policaju) as a coating for Tommy Atkins mangoes, Chem. Pap. 64 (2010) 475–481.
[31] F.O.M.S. Abreu, C. Bianchini, M.M.C. Forte, T.B.L. Kist, Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling behaviour of alginate–chitosan hydrogels, Carbohydr. Polym. 74 (2008) 283–289.
[32] R.J. Hunter, Zeta potential in colloid science: principles and applications, third ed. Academic Press, New York, 1988.
[33] H.C.B. Paula, F.J.S. Gomes, R.C.M. de Paula, Swelling studies of chitosan/cashew nut gum physical gels, Carbohydr. Polym. 48 (2002) 313–318.
[34] A.C. Pinheiro, A.I. Bourbon, C. Rochab, C. Ribeiro, J.M. Maia, M.P. Gonçalves, J.A. Teixeira, A.A. Vicente, Rheological characterization of κ-carrageenan/galactomannan and xanthan/galactomannan gels: comparison of galactomannans from non-traditional sources with conventional galactomannans, Carbohydr. Polym. 83 (2011) 392–399.
[35] M.G. Carneiro-da-Cunha, M.A. Cerqueira, B.W.S. Souza, J.A. Teixeira, A.A. Vicente, Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multinanolayered films production, Carbohydr. Polym. 85 (2011) 522–528.
[36] M.N. Kumar, R.A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, A.J. Domb, Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives, Chem. Rev. 104 (2004) 6017–6084.
[37] S. Yu, J. Hu, X. Pan, P. Yao, M. Jiang, Stable and pH-sensitive nanogels prepared by self-assembly of chitosan and ovalbumin, Langmuir 22 (2006) 2754–2759.
[38] R. Wongsagonsup, S. Shobsngob, B. Oonkhanond, S. Varavinit, Zeta potential (Î¶) and pasting properties of phosphorylated or crosslinked rice starches, Starch - StÃ ¤rke 57 (2005) 32–37.
[39] L. Ma, C. Gao, Z. Mao, J. Zhou, J. Shen, X. Hu, C. Han, Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering, Biomaterials 24 (26) (2003) 4833–4841.
[40] B. Smith, G. Dhanuja, S. Sridhar, Dehydration of 1,4-dioxane by pervaporation using modified blend membranes of chitosan and nylon 66, Carbohydr. Polym. 66 (2006) 463–472.
[41] J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, R. Gurny, Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications, Eur. J. Pharm. Biopharm. 57 (2004) 35–52.
[42] A. Pourjavadi, G.R. Mahdavinia, Superabsorbency, pH-sensitivity and swelling kinetics of partially hydrolyzed chitosan-g-poly(acrylamide) hydrogels, Turk. J. Chem. 30 (2006) 595–608.
[43] M.M. Nasef, E.A. El-Hefian, S. Saalah, A.H. Yahaya, Preparation and properties of non-crosslinked and ionically crosslinked chitosan/agar blended hydrogel films, E-J. Chem. 8 (S1) (2011) S409–S419.
[44] W. Burchard, Structure formation by polysaccharides in concentrated solution, Biomacromolecules 2 (2001) 342–353.
[45] H.D. Silva, M.A. Cerqueira, B.W.S. Souza, C. Ribeiro, M.C. Avides, M.A.C. Quintas, J.S.R. Coimbra, M.G. Carneiro-da-Cunha, A.A. Vicente, Nanoemulsions of β-carotene using a high-energy emulsification-evaporation technique, J. Food Eng. 102 (2011) 130–135.
[46] R.H. Müller, Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis, first ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1996.
[47] P. Atkins, J. De Paula, Atkins' physical chemistry, ninth ed. W. H. Freeman and Company, New York, 2010.
[48] C. Chang, B. Duan, J. Cai, L. Zhang, Superabsorbent hydrogels based on cellulose for smart swelling and controllable delivery, Eur. Polym. J. 46 (2010) 92–100.

REGISTRO DE PATENTE BR 10 2014 014009-3 EM 10/06/2014 PELA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE (BR/PE)/UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP (BR/SP)


INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

Revista da
Propriedade
Industrial
Seção I

Nº 2291
02 de dezembro de 2014

Patentes
Desenhos Industriais
Contratos de Tecnologia
Programas de Computador
Indicações Geográficas
Topografias de Circuitos
Integrados

178 DIRPA - Despachos Relativos a Pedidos e Patentes RPI 2291 de 02/12/2014

(21) **BR 10 2014 014009-3** 2.1
(22) 10/06/2014
(71) UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (BR/PE) , UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP (BR/SP)

(22) 10/07/2014
(71) UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP (BR/SP) , VERDARTIS DESENVOLVIMENTO BIOTECNOLÓGICO LTDA-ME (BR/SP)
(74) MARIA APARECIDA DE SOUZA

(21) **BR 10 2014 017342-0** 2.1

(21) **BR 10 2014 020315-0** 2.1
(22) 15/08/2014
(71) KABUSHIKI KAISHA TOSHIBA (JP)
(74) LUIZ LEONARDOS & CIA - PROPRIEDADE INTELECTUAL

HIDROGEL A BASE DE POLISSACARÍDEOS NATURAIS, PROCESSOS E USOS

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

HIDROGEL A BASE DE POLISSACARÍDEOS NATURAIS, PROCESSO E USOS

Campo da Invenção

01. A presente invenção descreve um hidrogel obtido a partir de polissacarídeos naturais, como o Policaju (extraído da goma do cajueiro) e a Quitosana, além de descrever seu processo de obtenção e seus usos. A presente invenção se situa nos campos da química e bioquímica.

Antecedentes da Invenção

02. Hidrogéis são definidos como uma rede polimérica tridimensional que não se dissolve e é capaz de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos. Devido à sua capacidade de absorção de água, os hidrogéis têm tido ampla aplicação em diferentes áreas biotecnológicas, por exemplo, como materiais para lentes de contato e separação de biomoléculas ou células, matrizes para a imobilização de células, como dispositivos para a liberação controlada de compostos bioativos, em práticas clínicas da medicina experimental para a engenharia e regeneração de tecidos, diagnósticos, além de servirem de materiais de barreira para regular aderências biológicas.

03. O Polissacarídeo proveniente da goma do cajueiro Anacardium occidentale L. (Policaju) vem sendo amplamente estudado e tem apresentado resultados satisfatórios no processo de cicatrização de lesões cutâneas. A quitosana, outro polissacarídeo, também tem sido investigada pela comunidade científica em aplicações biomédicas e terapêuticas, por possuir uma excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, propriedades curativas e hemostáticas, bem como atividade antimicrobiana.

04. Ambos Policaju e Quitosana têm sido reportados na literatura como matérias-primas potenciais para formarem hidrogéis; contudo, algumas vezes estes polissacarídeos são modificados quimicamente com a adição de radicais ativos, como grupamentos carboxila ou amino, ou através de ligantes químicos e interações físicas.

05. Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

06. O artigo "Chitosan/cashewgumnanogels for essentialoilencapsulation" de Flávia O.M.S. Abreua, Erick F. Oliveiraa, Haroldo C.B. Paulaa, Regina C.M. de Paulab, com publicação em 1 de agosto de 2012, revela o desenvolvimento de matrizes poliméricas de nano géis feitos de Quitosana e goma de caju para encapsulamento de óleo essencial. O artigo revela a combinação de goma de caju e quitosana nas concentrações (proporções) 1:10, 1:2, 1:1. 2:1 e 10:1. Entretanto, apesar do artigo revelar as combinações de Quitosana com a goma de caju, a presente invenção difere do referido artigo por apresentar concentrações diferentes. Além disso, o método e o uso prático proposto pelo artigo também difere do presente desenvolvimento.

07. O documento WO2013091056A1, publicado em 27 de junho de 2013, revela composições farmacêuticas compreendendo o extrato de Arrabidae Chica em sistemas de liberação controlada. São usados materiais naturais ou polímeros modificados e/ou sintéticos como materiais de liberação controlada no processo de produção dessa composição. Dentre os materiais utilizados no sistema de liberação controlada são citados como exemplo de polímero natural a goma de caju e como exemplo de biopolímero modificado a quitosana. Além disso, o documento revela o uso da composição farmacêutica para preparar drogas medicinais para a cura de feridas de pele. Entretanto, a composição do referido documento é feita obrigatoriamente a partir de extrato de Arrabidae Chica que difere da composição do hidrogel a base de polissacarídeos naturais da presente invenção.

08. Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

09. Resta na técnica, portanto, a necessidade de uma criação de hidrogéis contendo policaju e quitosana sem que hajam modificações em suas estruturas químicas o que garante economia no processo e evita o uso de

produtos sintéticos. Além disso, o processo de obtenção dos hidrogéis a base de polissacarídeos naturais utilizado nesta invenção apresenta vantagens pela redução no número de etapas e no tempo de preparo formando hidrogéis homogêneos com um menor tempo de agitação. O uso prático para esse hidrogel como curativo tópico também é carente nos antecedentes da invenção.

Sumário da Invenção

10. Dessa forma, a presente invenção vem resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir da criação de hidrogéis contendo policaju e quitosana sem que hajam modificações em suas estruturas químicas,

11. Em um primeiro aspecto, a presente invenção apresenta um hidrogel a base de polissacarídeos naturais compreendido por uma combinação de goma de caju e quitosana.

12. Em uma realização preferencial, a proporção entre goma de caju e a quitosana varia entre 1:1 a 2:10 (m/m).

13. Em uma realização preferencial, a proporção entre goma de caju e a quitosana está entre 1:4 a 2:3 (m/m).

14. Em uma realização preferencial, a estrutura possui macroporos que variam entre 6 e 72 micrometros de diâmetro.

15. Em uma realização preferencial, a goma de caju é o policaju Anacardium occidentale L.

16. Em uma realização preferencial, o hidrogel compreende pH entre 4,0 e 7,0.

17. Em uma realização preferencial, o hidrogel é um agente antimicrobiano.

18. Em uma realização preferencial, o hidrogel é um cicatrizante tópico.

19. Em um segundo aspecto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de um hidrogel com as seguintes etapas:

a) Diluição dos polissacarídeos de quitosana e goma de caju em ácido lático

b) Preparação de um pré-gel de quitosana;

c) Adição de solução de goma de caju sobre o pré-gel de quitosana até uma diluição entre 1:1 a 2:10 (m/m);

d) Aplicação de agitação de pelo menos 7000 rpm;

e) Ajuste do pH do gel obtido para pH entre 4,0 e 7,0.

f) Secagem do gel obtido.

20. Em uma realização preferencial, o processo compreende as seguintes etapas de preparação do pré-gel de quitosana:

a) Adição de uma solução 0,1M de CaCl2 a uma solução de quitosana;

b) Aplicação de agitação de pelo menos 7000 rpm por pelo menos 20 minutos.

21. Em uma realização preferencial, o processo compreende uma etapa da aplicação de agitação de pelo menos 7000 rpm por pelo menos 20 minutos.

22. Em um terceiro aspecto, a presente invenção apresenta o uso de um hidrogel para preparação de um curativo para tratar lesões cutâneas ou ósseas.

23. Em um quarto aspecto, a presente invenção apresenta o uso do hidrogel como um redutor de absorção de gorduras e colesterol.

24. Em uma realização preferencial, o uso de hidrogel é para fabricação de fibra sintética alimentar.

25. Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

26. Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente é apresentado as presentes figuras:

27. A Figura 1 mostra a absorção de água do hidrogel a base de polissacarídeos naturais (1:4 e 2:3) a pH 5,0 durante um período de 48h sob imersão em água. Cada leitura foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em média + desvio padrão.

28. A Figura 2 mostra o hidrogel a base de polissacarídeos naturais seco e hidratado após um período de 48h. A – 1:4; B – 2:3. Os quadros inseridos mostram as soluções dos polissacarídeos policaju 10% (p/v) e quitosana 1% (p/v).

29. A Figura 3 mostra as micrografias eletrônicas de varredura do corte transversal em crio fratura dos hidrogéis a base de polissacarídeos naturais A e B – 1:4, C e D – 2:3.

30. A Figura 4 mostra o espectro mecânico dos hidrogéis a base de polissacarídeos naturais a 25 °C: A - 2:3, B - 1:4, C - hidrogel de quitosana (G': modulo elástico (□), G": modulo viscoso (■) e [η*]: viscosidade complexa (●)). D – Viscosidade aparente X taxa de cisalhamento dos hidrogéis a base de polissacarídeos naturais 1:4 (●) e 2:3 (▲) e o hidrogel de quitosana (■).

31. A Figura 5 mostra os aspectos macroscópicos da evolução do processo de reparação cutânea, após o 3º, 7º e 14º dias, das lesões cutâneas induzidas e tratadas com uma única aplicação de 1mL de NaCl 0,15M (C- grupo controle) e de 1mL do hidrogel (H – grupo tratado com hidrogel a base de polissacarídeos naturais 1:4) após o ato cirúrgico.

32. A Figura 6 mostra a avaliação da regressão da área da ferida no 3º dia pós-operatório (C3- Controle, tratadas com uma única aplicação de 1mL de NaCl 0,15M; H3- grupo tratado com 1mL do hidrogel a base de polissacarídeos naturais 1:4).

33. A Figura 7 mostra Avaliação da regressão da área da ferida no 7º dia pós-operatório (C7- Controle, tratadas com uma única aplicação de 1mL de NaCl 0,15M; H7- grupo tratado com 1mL do hidrogel a base de polissacarídeos naturais 1:4).

34. A Figura 8 mostra Avaliação da regressão da área da ferida no 14º dia pós operatório (C14- Controle, tratadas com uma única aplicação de 1mL de NaCl 0,15M; H14- grupo tratado com 1mL do hidrogel a base de polissacarídeos naturais 1:4).

35. A Figura 9 mostra Aspecto microscópico da evolução do reparo cutâneo após 3 dias coradas com Picrosirius (A e B) e 14 dias coradas com

hematoxilina e eosina (C e D) sob tratamento com 1 mL de NaCl 0,15 M e 1 mL de hidrogel a base de polissacarídeos naturais 1:4.

Descrição Detalhada da Invenção

36. A presente invenção se refere a um hidrogel a base de polissacarídeos naturais compreendido por uma combinação de goma de caju e quitosana.

37. Em um segundo aspecto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de um hidrogel com as seguintes etapas:

g) Diluição dos polissacarídeos de quitosana e goma de caju em ácido lático

h) Preparação de um pré-gel de quitosana;

i) Adição de solução de goma de caju sobre o pré-gel de quitosana até uma diluição entre 1:1 a 2:10 (m/m);

j) Aplicação de agitação de pelo menos 7000 rpm;

k) Ajuste do pH do gel obtido para pH entre 4,0 e 7,0.

l) Secagem do gel obtido.

38. O processo de obtenção de um hidrogel vem a solucionar o problema de homogeneização a partir da agitação de pelo menos 7000 rpm.

39. Em um terceiro aspecto, a presente invenção apresenta o uso de um hidrogel para preparação de um curativo para tratar lesões cutâneas ou ósseas.

40. Em um quarto aspecto, a presente invenção apresenta o uso do hidrogel como um redutor de absorção de gorduras e colesterol.

41. O processo de obtenção de um hidrogel de polissacarídeos naturais de quitosana e goma de caju vêm a solucionar o problema da obtenção homogênea de um hidrogel contendo polissacarídeos sem modificações em suas estruturas químicas, com aplicações de cicatrização em lesões cutâneas. A obtenção homogênea foi solucionada a partir de uma agitação de 7000 rpm. Além disso, o uso de polissacarídeos sem modificações em suas estruturas químicas evita o uso de produtos sintéticos. A combinação de goma de caju com quitosana proporcionou maior tempo de armazenamento á temperatura ambiente do

hidrogel por conter propriedades antimicrobianas, evitando a contaminação por micro-organismos. Além disso, o hidrogel pode ser aplicado como curativo tópico.

42. A seguir são definidos alguns dos termos que são apresentados ao longo do pedido de patente.

Hidrogel

43. No contexto do presente desenvolvimento, o termo "Hidrogel" deve ser entendido como uma rede polimérica tridimensional hidrofílica que não se dissolve e é capaz de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos.

44. Em uma realização preferencial, os grupamentos hidrofílicos da matriz polimérica são hidratados e geram uma estrutura em "rede" dos hidrogéis. O termo "rede" está relacionado as ligações químicas ou físicas entre os grupamentos ativos dos polímeros envolvidos.

Polissacarídeos naturais

45. No contexto do presente desenvolvimento, o termo "Polissacarídeos naturais" deve ser entendido como polissacarídeos que não tiveram modificações em suas estruturas químicas.

Combinação de goma de caju e quitosana

46. No contexto do presente desenvolvimento, o termo "combinação de goma de caju e quitosana" deve ser entendido como a junção de polissacarídeos naturais como a goma de caju, extraído da goma do cajueiro Anacardium occidentale L, e a quitosana, sem a modificação de suas estruturas.

Macroporos

47. No contexto do presente desenvolvimento, o termo "macroporos" deve ser entendido como poros presentes na arquitetura da matriz do hidrogel, que variam de 6 e 72 micrometros de diâmetro.

Agente antimicrobiano

48. No contexto do presente desenvolvimento, o termo "agente microbiano" deve ser entendido como uma substância que possui propriedades antimicrobianas, ou seja, que inibe o desenvolvimento de micro-organismos.

Cicatrizante tópico

49. No contexto do presente desenvolvimento, o termo "cicatrizante tópico" deve ser entendido como uma substância que possui propriedades cicatrizantes para o uso em lesões cutâneas ou ósseas.

Processo de obtenção de um hidrogel

50. No contexto do presente desenvolvimento, o termo "processo de obtenção de um hidrogel" deve ser entendido como as etapas sequenciais para a obtenção de um hidrogel com a combinação de goma de caju e quitosana.

Usos

51. No contexto do presente desenvolvimento, o termo "usos" deve ser entendido como método e aplicação do produto da presente invenção.

Exemplo 1. Realização Preferencial

52. Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

53. O presente projeto trata-se de um processo de obtenção de hidrogéis a base dos polissacarídeos naturais policaju (extraído da goma do cajueiro Anacardium occidentale L.) e quitosana, contendo cloreto de cálcio como quelante de íons no processo de polimerização. Como produtos finais são descritos hidrogéis de policaju:quitosana (1:4 e 2:3), que podem ser utilizados como sistema de liberação de biomoléculas para diversas aplicações biotecnológicas. Pelas propriedades antimicrobianas da quitosana e cicatrizante do policaju, verificadas até o momento, estes hidrogéis demonstraram potencial de uso como curativos tópicos para acelerar o processo de cicatrização de lesões cutâneas ou para uso nas aplicações biotecnológicas.

54. O processo detalhado para obtenção do hidrogéis a base de polissacarídeos naturais consiste na utilização de polissacarídeos naturais de policaju (10% p/v) e de quitosana (1% p/v) sem modificações em suas estruturas químicas, obtidos por diluição em ácido lático a 1,0% (p/v). Em um primeiro momento, 0,1 mol/L de CaCl2 (1% v/v do volume final da mistura desejada) foi adicionada a um béquer contendo a solução de quitosana. A seguir foi utilizado

um UltraTurrax (IKA,U.S.A.) no processo de agitação (7000 rpm) por 20 min para formação de um pré-gel de quitosana. Em um segundo momento, foi extrusada a solução de policaju através de uma agulha de seringa (caliber 27G), com fluxo de 1,0 ml/min, ao béquer contendo o pré-gel de quitosana. Foram feitas misturas com proporções de 1:4 e 2:3 e deixadas sob agitação (7000 rpm) em um Ultra-Turra por mais 20 min. Em seguida, os pré-géis a base de polissacarídeos naturais (1:4 ou 2:3) tiveram o seu pH ajustados para 5,0 com NaOH 1,0M e então volumes de 25 mL dos mesmos foram depositados em placas de petri (90 x 15 mm), secas a temperatura de 40°C em estufa por 16 horas. Os filmes obtidos foram hidratados com 5 mL de água destilada. O produto obtido foram os hidrogéis a base de polissacarídeos naturais (1:4 ou 2:3).

55. O Hidrogel do presente projeto possui vários usos práticos, entre eles mecanismos de defesas e adubação na agricultura, redutor de absorção de gorduras e colesterol como fibra sintética na indústria alimentar, cicatrizante de feridas cutâneas como enxertos para reparo ósseo na indústria médica e antimicrobiana na indústria biotecnológica.

56. Foram feitos alguns testes entre as diferentes proporções obtidas de hidrogéis a base de polissacarídeos naturais (1:4 ou 2:3), especificados abaixo:

57. O primeiro teste foi a avaliação do hidrogel de acordo com a sua capacidade de absorção de água. O hidrogel a base de polissacarídeos naturais (1:4) absorveu uma massa de água de cerca de 270% (3,7 vezes) do seu peso inicial após um período de 24h sob imersão em água. Sob o mesmo tempo de imersão de 24h, o hidrogel a base de polissacarídeos naturais (2:3) apresentou uma taxa de hidratação bem superior ao hidrogel a base de polissacarídeos (1:4) absorvendo uma massa de água de cerca de 320% (4,2 vezes) do seu peso inicial, como pode visualizado na Figura 1 e 2.

58. No segundo teste foi realizado micrografias eletrônicas de varredura dos hidrogéis a base de polissacarídeos (1:4 e 2:3) em corte transversal mostraram uma matriz com uma arquitetura de macroporos com diferenças significantes no tamanho dos poros, sendo mais uniformes para o hidrogel a base de polissacarídeos (1:4) que apresentou poros com tamanhos de

aproximadamente 6 micrômetros, o tornando um bom candidato a aplicações biotecnológicas na liberação controlada de biomoléculas. Quanto aos hidrogéis a base de polissacarídeos (2:3) apresentaram poros maiores e mais assimétricos com até 72 micrometros de diâmetro, explicando o porquê do mesmo absorver mais massa de água que o hidrogel a base de polissacarídeos (1:4), e estas características sugerem uma potencial aplicação do hidrogel a base de polissacarídeos (2:3) na indústria médica e de cosméticos como gel tópico. A Figura 3 mostra os resultados das micrografias eletrônicas de varredura dos hidrogéis.

59. Em terceiro foi realizado o teste do espectro mecânico dos hidrogéis a base de polissacarídeos (1:4 e 2:3), que mostrou um comportamento visco elástico típico com aumentos na viscosidade complexa em função da frequência; contudo o hidrogel a base de polissacarídeos (2:3) possui uma matriz mais fraca que o hidrogel a base de polissacarídeos (1:4) o que pode ser visualizado pela redução no intercruzamento entre os módulos elástico (G') e viscoso (G") (Observar nos gráficos abaixo). Pode ser visualizado ainda, que quanto maior o conteúdo de policaju, menor é a viscosidade aparente, o que significa que o hidrogel a base de polissacarídeos (1:4) apresenta uma maior interação entre os polissacarídeos envolvidos na sua formulação que o hidrogel a base de polissacarídeos (2:3). Os resultados desse teste podem ser vistos na Figura 4. Este comportamento visco elástico característico dos hidrogéis os tornam bons candidatos para serem aplicados como géis tópicos.

60. O quarto e último teste foi realizado com o propósito de testar a eficácia do hidrogel a base de polissacarídeos (1:4) no processo de cicatrização de lesões cutâneas. Avaliação clínica ao longo de 14 dias pós-operatório de aplicação tópica única de 1,0 ml do hidrogel a base de polissacarídeos (1:4). Foi observado que no 3º dias as lesões cutâneas in vivo realizadas em ratos Wistar tratados com o hidrogel a base de polissacarídeos 1:4) regrediram cerca de 20% quando comparadas ao ratos sem tratamento. Este resultado foi confirmado pela avaliação histopatológica, onde foi observado uma maior deposição de fibras de colágenos por toda periferia da lesão em comparação ao grupo controle. No final

de 14 dias o grupo tratado com o hidrogel a base de polissacarídeos naturais(1:4) mostrou uma melhor cicatrização em relação ao grupo controle por apresentar uma maior camada de tecido revitalizado, como pode ser visto na Figura 5 e 6.

61. Após o terceiro dia da operação foi feita uma avaliação da regressão da área da ferida. Com a avaliação, foi feita uma comparação entre o subgrupo tratado com o hidrogel e o controle utilizando o método de analise de variância (ANOVA) e o teste de Bonferroni para comparações múltiplas ($p<0,05$), como pode ser visto na Figura 7.

62. Após o décimo quarto dia da operação foi feita uma Avaliação da regressão da área da ferida. Com a avaliação, foi feita uma comparação entre o subgrupo tratado com o hidrogel e o controle utilizando o método de analise de variância (ANOVA) e o teste de Bonferroni para comparações múltiplas ($p<0,05$), como pode ser visto na Figura 8.

63. No lugar indicado pela letra A na Figura 9, foi feito um tratamento com NaCl 0,15 M após 3 dias pós-operatório. Foi observado a presença de uma crosta fibrino-leucocitária irregular, como pode ser visto na Figura 9 por uma seta azul, e deposição leve de colágeno na periferia da lesão pelas setas laranjas.

64. No lugar indicado pela letra B na Figura 9, foi feito um tratamento com hidrogel a base de polissacarídeos naturais 1:4 após 3 dias pós-operatório. Foi o observado a presença de uma crosta consistente, indicadas pelas setas azuis na Figura 9, e deposição de colágeno por toda a extensão da lesão, indicadas pelas setas laranjas na Figura 9.

65. No lugar indicado pela letra C na Figura 9, foi feito um tratamento com NaCl 0,15 M após 14 dias pós-operatório. Foi observado uma lesão revitalizada com presença de zona queratinizada ainda leve, indicados pela seta vermelha na Figura 9, e o início da formação de anexos, indicados pela seta verde na Figura 9.

66. No lugar indicado pela letra D na Figura 9, foi feio um tratamento com o hidrogel a base de polissacarídeos naturais 1:4 após 14 dias pós-operatório. Foi observado uma lesão revitalizada com início da formação dos anexos, indicados pela seta verde na Figura 9, a presença de camada delgada de

queratina, indicada pela seta vermelha na Figura 9, e bordos da lesão, indicados pelas setas brancas na Figura9, evidenciando a contração/revitalização da lesão. As setas duplas nos lugares indicados pelas letras C e D mostram a camada total de tecido revitalizado.

67. Em resumo do teste de cicatrização, foi observado que com três dias de tratamento, as lesões cutâneas in vivo realizadas em ratos Wistar tratados com o hidrogel a base de polissacarídeos (1:4), já haviam regredido cerca de 20% quando comparadas aos ratos sem tratamento. No final de 14 dias o hidrogel a base de polissacarídeos (1:4) mostrou ser útil em acelerar o processo de cicatrização de lesões cutâneas.

68. Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

HIDROGEL A BASE DE POLISSACARÍDEOS NATURAIS, PROCESSO E USOS

1. Hidrogel a base de polissacarídeos naturais caracterizado por compreender uma combinação de goma de caju e quitosana.

2. Hidrogel, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela proporção entre goma de caju e a quitosana variar entre 1:1 a 2:10 (m/m).

3. Hidrogel, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela proporção entre goma de caju e a quitosana estar entre 1:4 a 2:3 (m/m).

4. Hidrogel, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela estrutura possuir macroporos que variam entre 6 e 72 micrometros de diâmetro.

5. Hidrogel, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela goma de caju ser o policaju Anacardium occidentale L.

6. Hidrogel, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender pH entre 4,0 e 7,0.

7. Hidrogel, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser um agente antimicrobiano.

8. Hidrogel, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser um cicatrizante tópico.

9. Processo de obtenção de um hidrogel caracterizado por compreender as seguintes etapas: diluição dos polissacarídeos de quitosana e goma de caju em ácido lático; preparação de um pré-gel de quitosana; adição de solução de goma de caju sobre o pré-gel de quitosana até uma diluição entre 1:1 a 2:10 (m/m); aplicação de agitação de pelo menos 7000 rpm; ajuste do pH do gel obtido para pH entre 4,0 e 7,0; secagem do gel obtido.

10. Processo de obtenção do hidrogel, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por compreender as seguintes etapas de preparação do pré-gel de quitosana: adição de uma solução 0,1M de CaCl2 a uma solução de quitosana; aplicação de agitação de pelo menos 7000 rpm por pelo menos 20 minutos.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por compreender uma etapa da aplicação de agitação de pelo menos 7000 rpm por pelo menos 20 minutos.

12. Uso de um hidrogel conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 caracterizado por ser para preparação de um curativo para tratar lesões cutâneas ou ósseas.

13. Uso de hidrogel conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 caracterizado por ser um redutor de absorção de gorduras e colesterol.

14. Uso de hidrogel, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por ser para fabricação de fibra sintética alimentar.

FIGURAS

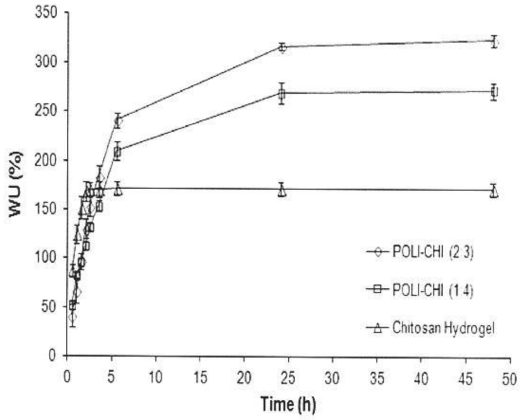


Figura 1

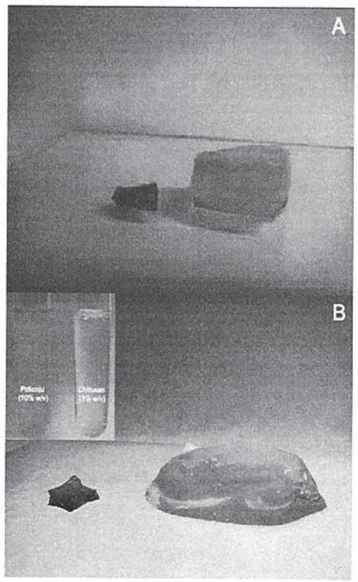


Figura 2

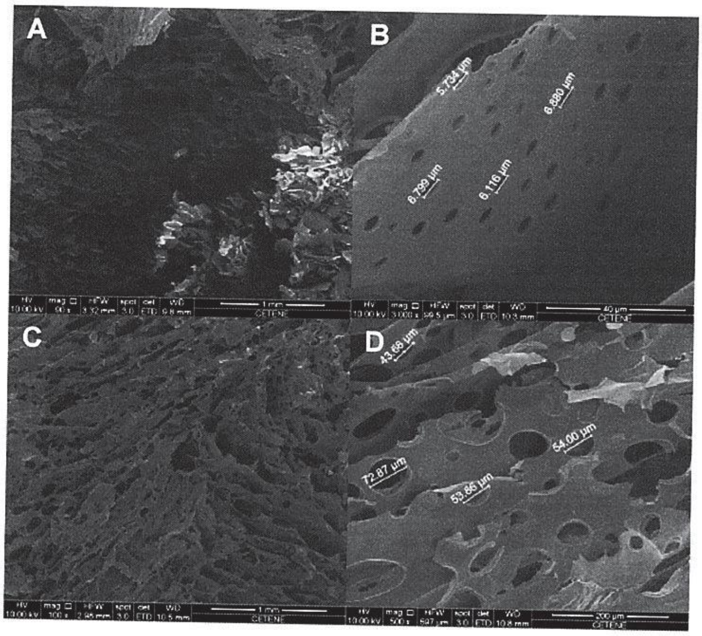


Figura 3

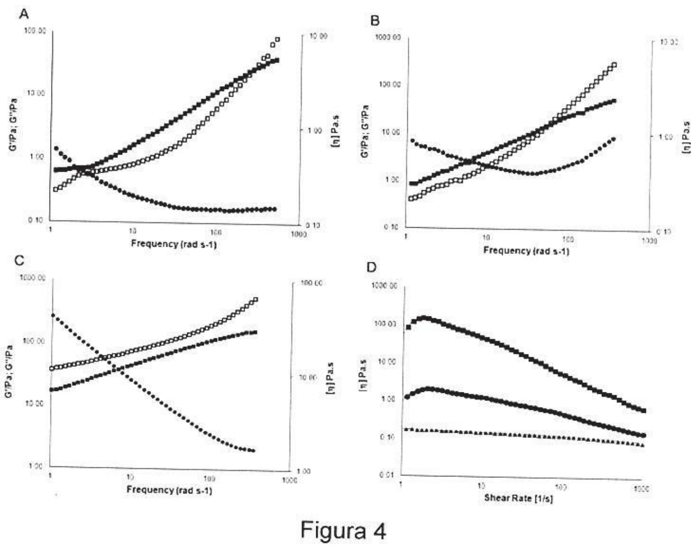


Figura 4

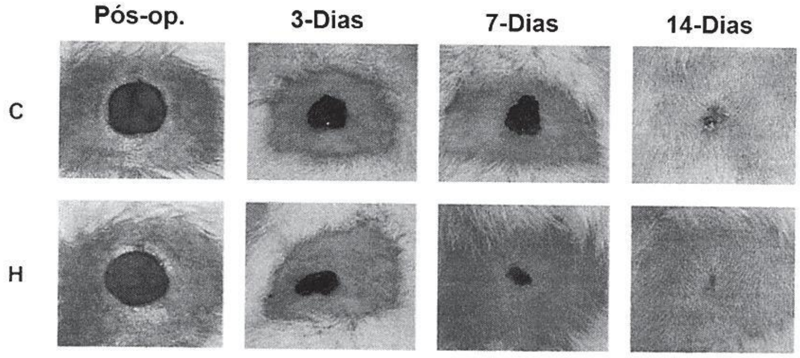


Figura 5

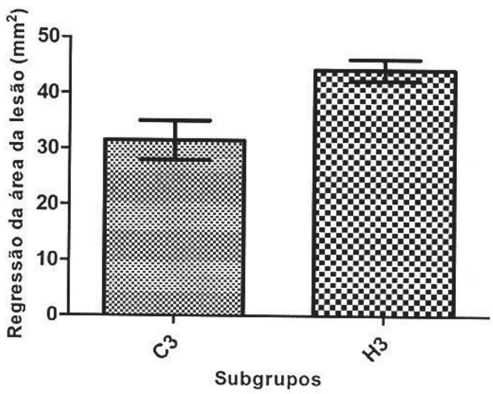


Figura 6

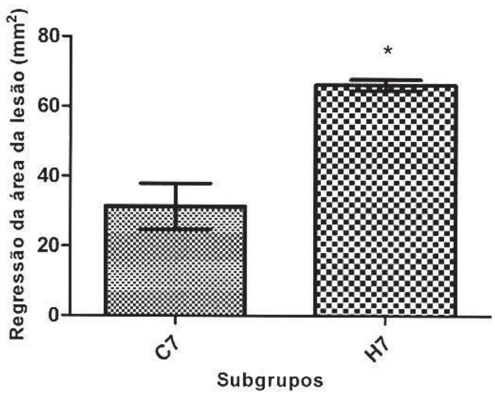


Figura 7

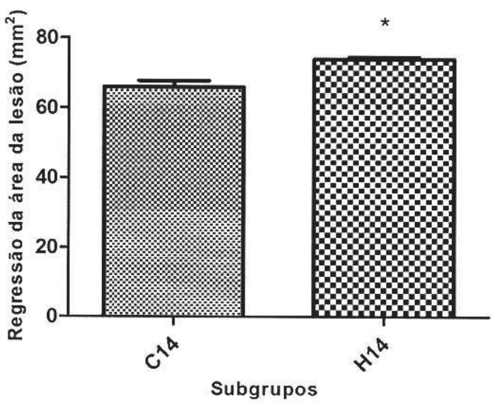


Figura 8

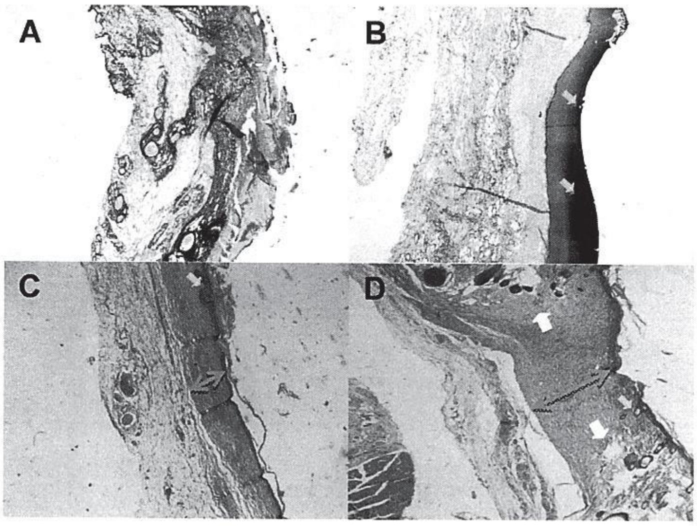


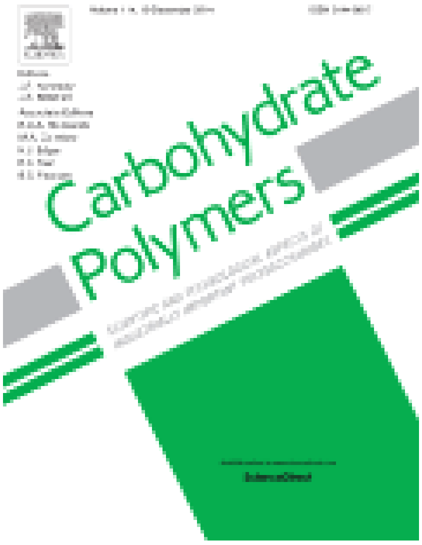
Figura 9

Resumo

HIDROGEL A BASE DE POLISSACARÍDEOS NATURAIS, PROCESSO E USOS

A presente invenção descreve um hidrogel obtido a partir de polissacarídeos naturais como o Policaju (extraído da goma do cajueiro Anacardium occidentale L.) e a Quitosana, além de descrever seu processo de obtenção e usos. Os hidrogéis a base de polissacarídeos naturais foram obtidos em duas proporções, 1:4 ou 2:3, sendo o hidrogel (1:4) grande candidato a aplicações tecnológicas e o hidrogel (2:3) à indústria médica. Especificamente, a presente invenção compreende um processo de obtenção de hidrogéis a base dos polissacarídeos policaju e quitosana, com aplicação de agitação de pelo menos 7000 rpm. Como produtos finais são descritos hidrogéis de policaju:quitosana (1:4 e 2:3), que podem ser utilizados como sistema de liberação de biomoléculas para diversas aplicações biotecnológicas, como o uso como curativos tópicos para acelerar o processo de cicatrização de lesões cutâneas ou para uso nas aplicações biotecnológicas, na indústria alimentícia como fibra alimentar e na agricultura. A presente invenção se situa nos campos da química e bioquímica.

ARTIGO II **- ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA CARBOHYDRATE POLYMERS**



ISSN: 0144-8617

IMPACT FACTOR: 3.916

Development and characterization of a new hydrogel of the galactomannan and κ-carrageenan.

Carbohydrate Polymers 134 (2015) 673–679

Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol

Development and characterization of a new hydrogel based on galactomannan and κ-carrageenan

Paulo A.G. Soares[a,b], José R.P. C de Seixas[a], Priscilla B.S. Albuquerque[a,b], Gustavo R.C. Santos[c], Paulo A.S. Mourão[c], Wilson Barros Jr.[d], Maria T.S. Correia[a], Maria G. Carneiro-da-Cunha[a,b,*]

[a] *Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420 Recife, PE, Brazil*
[b] *Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Campus Universitário, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-901 Recife, PE, Brazil*
[c] *Laboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho and Programa de Glicobiologia, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Ilha do Fundão, CEP 21941-913 Rio de Janeiro, RJ, Brazil*
[d] *Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Luiz Freire s/n, Cidade Universitária, CEP 50670-901 Recife, PE, Brazil*

A R T I C L E I N F O

Article history:
Received 28 April 2015
Received in revised form 14 August 2015
Accepted 14 August 2015
Available online 20 August 2015

Keywords:
Hydrogel characterization
Cassia grandis
Vegetal polysaccharides
Rheology
NMR

A B S T R A C T

A new hydrogel based on two natural polysaccharides was prepared in aqueous medium with 1.7% (w/v) galactomannan (from *Cassia grandis* seeds) and different concentrations of κ-carrageenan (0.3, 0.4 and 0.5% w/v), $CaCl_2$ (0.0, 0.1 and 0.2 M) and pH (5.0, 5.5 and 6.0), using a full factorial design based on rheological parameters. The best formulation was obtained with 1.7% (w/v) galactomannan and 0.5% (w/v) κ-carrageenan, containing 0.2 M $CaCl_2$ at pH 5.0. Nuclear magnetic resonance and scanning electron microscopy where used in order to characterize the hydrogel formulation. A shelf life study was carried out with this formulation along 90 days-period of storage at 4 °C, evaluating pH, color, microbial contamination and rheology. This hydrogel showed no significant changes in pH, no microbial contamination and became more translucent along the aging. Analyses by nuclear magnetic resonance and rheology showed a larger organization of the polysaccharides in the hydrogel matrix. The results demonstrated that this hydrogel was stable with possible applications in medical and cosmetic fields.

1. Introduction

Hydrogels are macromolecular networks formed from natural or synthetic hydrophilic polymers that can absorb and retain a significant amount of water without dissolving (Lefnaoui & Moulai-Mostefa, 2014; Ahmed, 2013). The hydrogel resistance to dissolution arises from cross-links between network chains, while their ability to absorb water arises from hydrophilic functional groups distributed along the polymeric backbone (Ahmed, 2013). Due to the combination of solid-like properties from the macromolecular network and liquid-like properties from the absorbed water, hydrogels exhibit viscoelasticity resembling that of biological tissue. In addition to these rheological properties, their high biocompatibility have attracted attention in drug delivery applications (Da-Lozzo et al., 2013), pharmaceuticals (Laurén et al., 2014), biomedical applications (Kenawy, Kamoun, Mohy Eldin, & El-Meligy, 2014), tissue engineering and regenerative medicine (Huang, He, & Wang, 2013), diagnostics (Feyzkhanova et al., 2014), wound dressing (De Cicco et al., 2014), separation of biomolecules or cells (Ahmad et al., 2014), barrier materials to regulate biological adhesions (Zhang et al., 2011), and biosensors (Liu et al., 2015).

When forming hydrogels, polysaccharides of natural origin have improved properties in comparison with synthetic polymers (Manjanna, Pramod Kumar, & Shivakumar, 2010). Among natural polymers, there are the gelling polymer agents as carrageenans, and also thickening polymers, such as galactomannans, that, although not producing network real cross-links, possess gel properties above some specific concentration. Kappa-carrageenan (κC) is obtained by alkaline extraction (or by modification of other carrageenans) from red seaweed (*Rhodophyceae*) (Prajapati, Maheriya, Jani, & Solanki, 2014). Without chemical modifications, it has the ability to form a strong three-dimensional network in presence of

* Corresponding author at: Universidade Federal de Pernambuco, Bioquímica, Av. Prof. Moraes Rego s/n, 50670-420 Recife, PE, Brazil. Tel.: +55 81 21268547; fax: +55 81 21268576.
E-mail address: mgcc1954@gmail.com (M.G. Carneiro-da-Cunha).

http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.042

counterions (K^+ and Ca^{+2}) when compared with other types of carrageenans (lambda-carrageenan). κC is composed of alternating residues of 3-linked β-D-galactopyranose 4-sulfate and 4-linked 3,6-anhydro-α-D-galactopyranose residues (Prajapati et al., 2014; Pinheiro et al., 2011). Due to its high hydrophilicity, mechanical strength, biocompatibility and biodegradability, this polymer has been mostly used in food industry as gelling, stabilizing and thickener agent (Dima, Cotârlet, Alexe, & Dima, 2014). Nevertheless it has also been used to reduce or to eliminate toxicity in biomedical applications (Muhamad, Fen, Hui, & Mustapha, 2011).

Galactomannans are widespread polysaccharides commonly extracted from the endosperm of numerous seed plants (particularly the *Leguminosae*) which develop energy-reserve and hydration functions (Prajapati et al., 2013). The galactomannan extracted from *Cassia grandis* seeds have a core constituted by 4-linked β-D-mannopyranose with a repetitive single branch of α-D-galactopyranosyl units linked to position 6 of the central chain (Albuquerque et al., 2014). Due to its high molecular weight, water solubility, non-ionic character, biocompatibility and gel properties in higher concentrations, this polysaccharide can be used in food, pharmaceutical, biomedical, cosmetic, textile and paper industries, especially as an emulsion stabilizer (Albuquerque et al., 2014; Pinheiro et al., 2011).

Various hydrogels formulated from natural polymers have been used in industry. However, it has become clear that hydrogels consisting of single polymer arrangements cannot meet entirely the demands in terms of both properties and performance (Ahmed, 2013). In order to improve gel properties, new hydrogels based on two or more polymers have been developed in the last years (Jang et al., 2014; Diao, Li, Xiao, Duan, & Xu, 2014; Soares et al., 2014; Dash, Foston, & Ragauskas, 2013; Martins et al., 2012). Sometimes, chemical modification in involved polymers, chemical crosslinks and/or physical interactions is necessary. Such mixed systems include polymer blends, copolymer, interpenetrating or semi-interpenetrating polymer networks, with desirable properties (Liu et al., 2014; Lv et al., 2014; Vudjung et al., 2014; Bhattacharyya & Ray, 2014).

Along the years, the use of rheology for characterization of viscoelastic properties in the production and application of polymeric materials such as gels and hydrogels has been essential (Albuquerque et al., 2014; Jang et al., 2014; Dash et al., 2013; Sandolo, Matricardi, Alhaique, & Coviello, 2007). The hydrogels behavior during flow and applied stress are important quality control parameters responsible for maintaining the products superiority and increase its shelf life. In this work we have developed a new hydrogel based upon optimized rheological characteristic of a mixture of κ-carrageenan and galactomannan from *C. grandis* seeds. This optimization was achieved via a full factorial design 2^3 by which changing pH and both κC and cation concentrations, the hydrogels formed were rheologicaly tested. In addition to a primary characterization of the new hydrogel, shelf life studies were also carried out to guarantee its features during storage, making it viable in biomaterial industry applications.

2. Material and methods

2.1. Material

The pods of *C. grandis* were collected at the rural zone of Pernambuco State, in the city of Angelim (Brazil), in July 2011. Ethanol 99.8%, acetone PA, NaCl and phenol were obtained from Vetec Fine Chemicals Ltda. (Brazil). κ-Carrageenan was purchased from Sigma Aldrich (U.S.A.). All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Extraction of the galactomannan from C. grandis seeds

The galactomannan from *C. grandis* seeds was extracted and purified according to the method described by Albuquerque et al. (2014). Briefly, dried seeds were boiled in distilled water 1:5 (w/v) at 100 °C for 1 h and maintained for 18 h at 25 °C to facilitate removal of the hull. The endosperm plus germ, were triturated in a blender with 0.1 M NaCl 5% (w/v) at 25 °C, filtered and precipitated with 46% ethanol 1:3 (v/v) for 24 h. The precipitate was filtered again, followed by a wash with 100% ethanol 1:3 (v/v) and twice with acetone P.A. 1:3 (v/v), with filtrations between each washing. The precipitated galactomannan obtained was dried in an oven at 100 °C and finally pulverized and kept in a dry place until further use.

2.3. Hydrogel preparation

Stock solutions of κC in different concentrations [0.3, 0.4 and 0.5% (w/v)] and galactomannan (1.7% w/v) were prepared. A known volume of κC was added into a beaker in addition to a known concentration of $CaCl_2$. The solution was maintained under magnetic stirring (850 rpm), at 50 °C during 20 min. The addition of $CaCl_2$ [1.0% (v/v) of the final volume of desired mixture] was necessary to ignite a crosslinking process. In order to evaluate the latter process, hydrogel samples with three $CaCl_2$ concentrations were actually utilized: 0 M, 0.1 M, and 0.2 M. After that, a well-known volume of galactomannan solution, was added into the beaker containing the κC + $CaCl_2$ solution at 1 ml/min flow rate, using a needle syringe (27G). The mixture was left stirring under 850 rpm at 50 °C, during additional 30 min. Several samples were prepared from the mixture adjusting their pH to 5.0, 5.5 or 6.0 using a 1 M HCl solution. These final samples, now named hydrogels, were distributed in a cell culture plate (6-well plate) and stored at 4 °C.

2.3.1. Experimental design and statistical analysis

The best hydrogel mixture was selected by monitoring the influence of the following independently controlled parameters: κ-carrageenan (κC) and $CaCl_2$ (Ci) concentrations, pH onto the measured complex viscosity (η^*), viscous–elastic moduli ratio ($G''/G' = \tan\delta$), and the phase transition temperature (T_t). The study was conducted employing a 2^3 full factorial design (see Supplementary material), in addition to a central point in quadruplicate to allow for the estimation of pure experimental error. The results were statistically validated by an analysis of variance (ANOVA) at a significance level of $p < 0.05$. All statistical and graphical analyses were carried out with the Statistica 8.0 program (SatSoft Inc., 2008, Tulsa, OK, USA).

2.4. Hydrogel characterization

2.4.1. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

One dimensional (1D) ^1H NMR spectra of the polysaccharides and hydrogels were recorded using a Bruker DRX 600 MHz apparatus with a triple resonance probe, as described previously by Tovar et al. (2012). Approximately 5 mg of each sample was dissolved in 0.5 ml of 99.9% deuterium oxide (Cambridge Isotope Laboratory, Cambridge, MA, USA). The spectra were recorded at different temperatures (25 °C to 55 °C) with HOD (deuterated water exhibiting a peak due to exchange with residual H_2O) suppression by presaturation. For NMR spectra, 32 scans were recorded using an inter-scan delay equal to 1 s and the chemical shifts were displayed relative to external trimethyl-silylpropionic acid at 0 ppm for ^1H. The range of temperature was made in order to observe the temperature influence on the hydrogel matrix.

2.4.2. Rheological measurements

All rheological measurements were carried out, in triplicate for each sample, according to Pinheiro et al. (2011) using a rheometer MCR301 (Anton-Paar, Austria), in a parallel plate geometry (diameter: 25 mm) cell with a gap between plates of 1 mm. In order to determine the appropriate strain for linear viscoelastic regime, preliminary strain sweeps were conducted at different frequencies (0.1, 1.0 and 10.0 Hz) for variable strains ranging from 0.1 to 10.0%. Frequency sweeps were carried out within a 0.1–100 Hz range, maintaining a linear viscoelastic regime (0.2% strain deformation). Moreover, the hydrogel was tested for temperature stability (see Supplementary material) at oscillatory mode (frequency = 1.0 Hz) for a range of temperature from 0 to 70 °C, at a rate of 5 °C/min increase. Unless explicitly mentioned, all rheological measurements were conducted at 25 °C.

2.4.3. Stability and shelf life studies

Triplicates of the most stable hydrogel (Following a full factorial test criterion—see Supplementary material) were storaged at 4 °C in sterile petri dishes (35 × 10 mm) and during 90 days-period, a shelf life study were carried out by pH, colorimetric, rheological measurements and microbiological analysis. After 1, 5, 10, 20, 30, 60 and 90 days, the hydrogel samples were taken randomly. To evaluate the microbiological contamination of the hydrogel, analyses of mesophilic aerobes, yeasts and molds, lactic acid bacteria and psychrotrophs were carried according to the methodology described by the Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Vanderzant & Splittstoesser, 1992). The hydrogels opacity was determined using a Minolta color meter (CR 400; Minolta, Japan) and according to the Hunterlab color scale. Following this method, the degree of opacity (*Y*) was calculated as the ratio between the opacity of each sample on a black standard (*Yb*) and the opacity of each sample on a white standard (*Yw*). An average of random three *Yb* and *Yw* measurements was used for calculations. The results were expressed as a percentage: $Y(\%) = 100\,(Yb/Yw)$. The rheological measurements were performed as described before.

2.4.4. Scanning electron microscopy (SEM)

The SEM surface scans of the hydrogel were conducted on a scanning electron microscope EVO LS15 (ZEISS, Germany) with an accelerating voltage of 10 kV under vacuum conditions. The hydrogel samples were prepared 24 h before measurements. For each sample internal matrix structure analysis, a cross-section of the hydrogel was lyophilized utilizing the cryofracture method. The lyophilized sample was attached to a coverslip via a coated thin film of chromium and carbon. The coating also worked to prevent the accumulation of static electric charge on the surface during electron irradiation and to avoid scanning faults and other image artifacts. The samples were sprayed with colloidal gold particles and then left drying at room temperature (25 °C) before scanning.

3. Results and discussion

3.1. Hydrogel characterization

In order to obtain an optimized hydrogel by mixing the galactomannan from *C. grandis* seeds and κ-carrageenan, a full factorial design 2^3 was performed (see Supplementary material). According to the results, it was possible to obtain a stable hydrogel composed by 1.7% (w/v) of galactomannan and 0.5% (w/v) of κ-carrageenan, with 0.2 M of $CaCl_2$ at pH 5.0 which was capable of supporting higher temperature (40.6 °C).

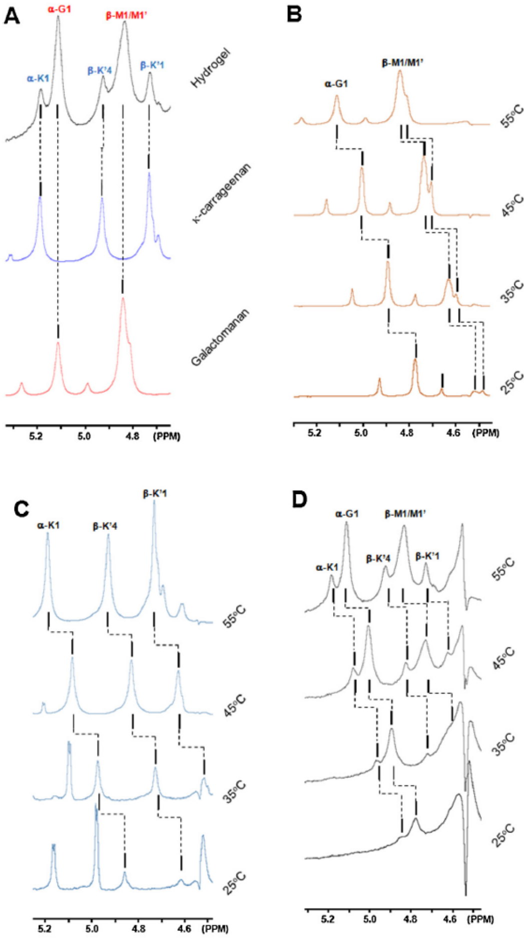


Fig. 1. One-dimensional ^{1}H NMR spectra (4.6–5.3 ppm region) of the purified galactomannan, κ-carrageenan and of hydrogel obtained by the mixture of these two polysaccharides at 45 °C (A). The impact of temperature variation was observed by the broken horizontal lines on the ^{1}H chemical shifts observed in the spectra of purified galactomannan (B), κ-carrageenan (C) and the hydrogel (D).

3.1.1. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

We characterized the hydrogel formed by κ-carrageenan and galactomannan using 1D ^{1}H NMR spectroscopy. The ^{1}H chemical shifts of these two polysaccharides are similar irrespective the spectra were run using purified polysaccharide solutions or hydrogel. Fig. 1 exemplifies this observation for the 4.6–5.3 ppm region of the spectra run at 45 °C. In this region, we can easily identify the anomeric protons of the α-galactopyranosyl (α-G1) and β-mannopyranosyl (β-M1) units at 5.11 and 4.84 ppm, respectively, of the galactomannan (bottom spectrum in Fig. 1A). It is also possible to visualize the anomeric protons of the 3,6-anhydro-α-galactose (α-K1) and of the β-galactopyranosyl unit (β-K1) at 5.19 and 4.72 ppm, respectively, of the κ-carrageenan (middle spectrum at 45 °C in Fig. 1A). We can also identify H4 of the 4-sulfated β-galactose (β-K4) due to the characteristic downfield shift of the 4-sulfation site. These results are in accordance with the

Table 1
Color parameters L^* and Y for the galactomannan/κ-carrageenan hydrogel along 90 days-period.

Days	L^*	Y (%)
1st	69.96 ± 0.91[a]	14.42 ± 0.81[a]
5th	72.72 ± 1.97[a]	13.40 ± 0.78[a]
10th	86.66 ± 5.93[b]	10.41 ± 0.36[b]
15th	90.03 ± 2.27[b]	9.89 ± 0.29[c]
30th	88.35 ± 2.55[b]	9.90 ± 0.27[c]
60th	87.91 ± 4.45[b]	12.76 ± 0.78[b]
90th	89.98 ± 1.91[b]	11.10 ± 0.49[b]

L^* (Light); Y (%) (Opacity); Values expressed as an average ± standard deviation. [a–c] Different superscript letters in the same column indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$.).

solution NMR analysis of galactomannans and carrageenans previously reported in literature (Albuquerque et al., 2014; Cheng et al., 2013; Yao, Wu, Zhang, & Du, 2014; Farias et al., 2008; Bosco, Segre, Miertus, Cesa'ro, & Paoletti, 2005).

These characteristic ^{1}H NMR signals of the galactomannan and κ-carrageenan show no significant shifts in the ^{1}H NMR spectrum of the hydrogel (top spectrum in Fig. 1A), except for a very modest ~0.02 ppm upfield shift of β-K4. Possibly this is a consequence of interaction of 4-sulfate groups with calcium ions in the hydrogel formulation. These results indicate that κ-carrageenan and galactomannan form a physical type hydrogel, containing semi-interpenetrating polymer network (SEMI-IPN). Clearly, these polysaccharides did not form a chemical type hydrogel, which would result in shifts of their ^{1}H-signals.

We also investigated the impact of temperature on the ^{1}H spectra of the purified galactomannan (Fig. 1B) and κ-carrageenan (Fig. 1C) and of hydrogel (Fig. 1D). The ^{1}H signals show marked downfield shifts as the temperature increases from 25 °C to 55 °C (shifts indicated by horizontal broken lines in the Panels). However, more significant, the shifts are similar on the spectra run with the purified polysaccharides solutions (Fig. 1B and C) or with the hydrogel (Fig. 1D). Some ^{1}H signals are broad or even not identified at 25 °C, especially those of the β-anomers, mostly because of the interference of HOD signal at this temperature and of the water suppression by presaturation. This is particularly relevant for the ^{1}H spectra of the hydrogel at 25 °C and 35 °C (bottom panels in Fig. 1D), which suggest strong intermolecular interaction and self-organization of the polysaccharides in the gel state. The ^{1}H signals were recovered as the temperature increases, indicating disruption of the self-organization due to the increased dynamic of the polysaccharides solutions. This is a typical phenomenon of viscous solutions obtained with macromolecules (Shapiro, 2011).

3.1.2. Stability and shelf life evaluation of the hydrogel

The pH is an important parameter for evaluation of stability and biocompatibility of hydrogel. The hydrogel formed using galactomannan and κ-carrageenan showed an average pH = 5.70, without significant variations ($p \le 0.05$). According to Segura, Camargo Junior, Bagatin, and Campos (2010), this pH range is considered suitable for various applications, especially in cosmetics, food and pharmaceutical industries. According to the microbiological analysis, there was no observed microorganism growth in any of the experimentation days (data not shown). The colorimetric results for the L^* and Y parameters are shown in Table 1. L^* denotes the light content into the sample. The opacity (Y%) is another important characteristic that indicates the capacity of biomaterials to act as a barrier against light, and it is also a way to relate the major or minor degree of miscibility of polymers (Li & Shimizu, 2006).

The experimental results have shown a significant increase in luminosity of approximately 24% along the course of the measurements followed by a reduction of opacity of 29%. On the first days it is most likely that the hydrogel is on a globular/double helix stage which scatters light more efficiently. With the aging of the hydrogel, as it keeps reacting with the free calcium ions, these helices start aggregating and organizing in junction zones in a way that reduces scattering and turns it more transparent. This comportment was also observed by the changes in opacity, which exhibited a reduction until the 30th day, with a small increase at the final of the experimental time (60th and 90th days). This confirmed the reorganization of the polysaccharide chains of the hydrogel that is reflected in a less opaque macroscopic sample, it is, more transparent. A similar observation was reported by Silva, Pereira, Carvalho, and Ferrua (2007), who showed that starch gels suffer structural changes along its formation with decreasing opacity.

3.1.3. Rheometry

The hydrogel rheological studies are depicted on Fig. 2 Fig. 2A shows an oscillatory experiment where the elastic (storage), G', and dissipation (loss), G'', moduli are monitored as a function of the oscillatory frequency. Regarding hydrogels, once the crosslinks between the different chains of the polymers are established, the network thus obtained shows a solid viscoelastic behavior and, sometimes, a pure elastic behavior (Hennink & van Nostrum, 2002; Cuggino et al., 2008). This can be visualized in Fig. 2A, which shows $G' \gg G''$ as a function of the oscillatory frequency. For longer periods of shelf storage, the gel matrix is reinforced and, in addition to $G' \gg G''$, the values of individual moduli do not vary substantially with frequency. These characteristics are a pristine signature of gel rheological behavior. Visually the hydrogel is self-standing (see Supplementary material). For short shelf storage periods, although $G' > G''$ and the gel behavior still preserved, the data indicate that the long-range network structure is not fully developed. For instance, at higher frequencies, both storage and loss moduli increase indicating the presence of a small length scale structure. In Fig. 2A the elastic modulus G' increases too steeply in contrast to what is expected for continuous gels. Instead its behavior resembles that of a packing of emulsion droplets at the jamming transition. It is important to note the classical gel behavior (parallel G' to G'' as a function of frequency) occurs above the 15 days storage period. In addition, the gel formed can be considered a strong gel when compared to the pure galactomannan gel (Albuquerque et al., 2014). Therefore, during the shelf storage (4 °C storage temperature) period the gel long-range structure is consolidated. These results were similar to those obtained by Pinheiro et al. (2011), who reported long-range gellification for mixtures of κ-carrageenan and galactomannan extracted from *Gleditsia triacanthos* seeds (60/40, respectively) and *Sophora japonica* (60/40, respectively).

Macroscopic hydrogels can support only a limited amount of stress and break when stress or strain exceeds some yielding limit. The data show the two main characteristics of the formed gel: a linear elastic region where G' is constant regardless of the stress applied; and a yield stress where the gel structure is destroyed and the system starts flowing (Fig. 2B). Although G' and G'' lose meaning at nonlinear regions, we will consider the point at the cross over, when $G' = G''$, as the stress necessary to yield. Conversely G'' does not show a linear region. Instead there is a weak overshoot at the crossover point. This overshoot does not exist in pure galactomannan samples from *C. grandis* (Albuquerque et al., 2014) and is most likely due to the existence of long chains in the κ-carrageenan as also found in xanthan gum (Hyum, Kim, Ahn, & Lee, 2002). During a stress test, in order to keep oscillating frequency fixed, as the stress (strain) increases the shear rate has to increase. Slow structure relaxation depends on the applied shear rate and gets faster as the shear rate increases. That explains the increase in dissipation G'' as the stress increases. However there is a peak at the point where the shear rate reaches the oscillating frequency causing dissipation to become inefficient. Overall, the increase in loss, G'', or storage, G',

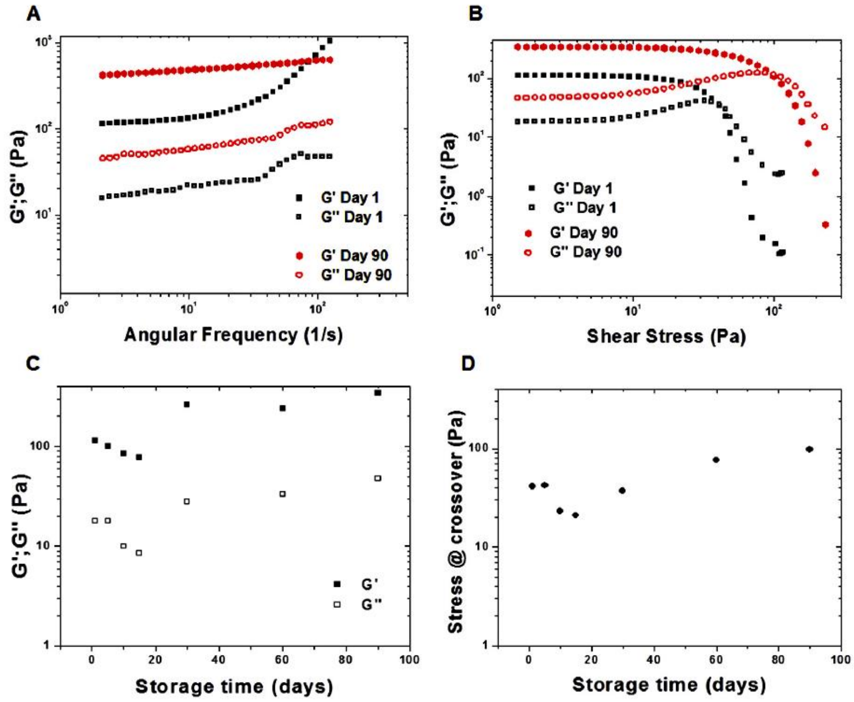


Fig. 2. Rheological measurements of the best hydrogel formulation obtained from the full factorial design 2^3. A—Elastic (G') and viscous (G'') moduli as a function of the angular frequency, dynamic oscillatory flow. B—Elastic (G') and viscous (G'') moduli as a function of the shear stress, dynamic oscillatory flow. C—Elastic (G') and viscous (G'') moduli as a function of the storage time (90 days). D—Stress at crossover as a function of the storage time (90 days).

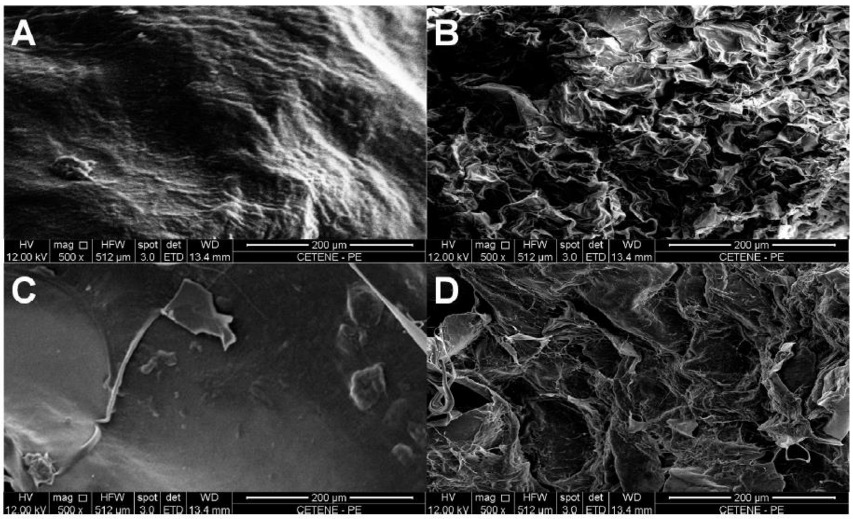


Fig. 3. SEM micrographs of the surface and matrix of the galactomannan/κ-carrageenan hydrogel at the first day (A and B, respectively) and after 90 days-period of storage at 4 °C (C and D, respectively).

moduli as a function of the storage time (Fig. 2C) corroborates what was previously discussed about an increase in the organization of the polysaccharide chains in the hydrogel matrix.

The elastic modulus for day 1 is very similar to the G' for pure galactomanan. It is worth noting that the galactomanan/κ-carragenanan combination is stiffer – higher G' – but less tougher, i.e. the area G' x stress is smaller than that of the pure galactomannan (Albuquerque et al., 2014). The accommodation of the interstitial entangled galactomannan network reduces the elastic modulus G' – there is a lower energy required to deform the network – at the same time that it increases the dissipation via the loss modulus locally. Finally, as the shelf storage period increases, there was an increase in the stress where the crossover between elastic and viscous moduli occurred (Fig. 2D). These results corroborate those presented in Fig. 2A, indicating that the hydrogel matrix was getting more organized and stiffer along the shelf storage period.

3.2. Scanning electron microscopy (SEM)

Studies of scanning electron microscopy were carried out to characterize the microstructure morphology of the freeze-dried galactomannan/κ-carrageenan hydrogel. Fig. 3 shows the SEM images of the surface and matrix of the hydrogel at the 1st day after preparation and after 90 days of storage at 4 °C. In the 1st day, the surface image indicates a rough and wavy morphology (Fig. 3A). In contrast, the matrix shows a 3D network, composed of 2D folded sheets, allowing for a reasonable interconnection between macropores (Fig. 3B). The roughness on the surface of the hydrogel is attributed to the presence of galactomannan (Lombardi & Mercê, 2003). It can also be observed an interconnection between pores that could be assigned to the crosslinking network formation between the sulfate group from κ-carrageenan chains and Ca^{+2} ions in the hydrogel formulation. Pore connectivity determines the easy flow of drugs and indicates if the hydrogel is appropriate for tissue engineering applications (Varghese, Chellappa, & Fathima, 2014).

After 90 days of storage at 4 °C, both surface and matrix of the hydrogel changed (Fig. 3C and D). The surface of hydrogel became less rough and the pores in the matrix became larger than the first day. This could be attributed to the organization of the polysaccharide chains in thin helices that starts to aggregate, thus reducing the fibers, and increasing the pores of the hydrogel matrix. Besides the fact that the porosity created by cryofracture method does not represent the hydrated porosity since the lyophilization process creates artifacts, the SEM analysis of the hydrogel remains interesting since these artifacts are linked to the real structures and the density of the hydrogels. The same observation was reported for thermosensitive chitosan hydrogels (Assaad, Maire, & Lerouge, 2015). The differences observed along the 90 days-period suggests that the hydrogel morphology can be modified by the aging time and depending on the targeted application, a smaller or larger porosity may be more favorable, given that porosity influences the drug release and cell invasion in tissue regeneration applications.

4. Conclusion

According to the results obtained of a full factorial design 2^3 based on rheological parameters, it was possible to obtain a stable hydrogel composed by 1.7% (w/v) of galactomannan (from *C. grandis* seeds) and 0.5% (w/v) of κ-carrageenan, with 0.2 M of $CaCl_2$ at pH 5.0. This hydrogel showed a temperature resistance until 42 °C without losing its shape. Furthermore, there were no significant changes in pH and no microbial contamination. Nevertheless it was observed a decrease in opacity and an increase in the transparency along of the 90 days-period of storage at 4 °C. The nuclear magnetic resonance has indicated the absence of covalent bonds which classify the investigated hydrogel as a physical gel, and confirmed that the temperature plays an important role in the maintenance of this physical gel matrix stability. Furthermore, the thermo-rheological tests confirmed a higher organization of the polysaccharides in the hydrogel matrix over the storage period with the elastic modulus always higher than the viscous modulus. The SEM analysis of the hydrogel matrix showed interconnected macropore architecture with a rough surface. These pore matrix interconnections may lead to an easy flow for biomolecules as well as scaffold matrices for tissue engineering. These results showed that this hydrogel has good and stable physical properties with potential application in medical and cosmetic industries.

Acknowledgments

P.A.G.S. is a recipient of a scholarship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the author P.B.S.A. is a recipient of a scholarship from the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), M.G.C.C., M.T.S.C. and P.A.S.M. express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants and fellowship. The authors acknowledge Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) and Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear by analitical support and CNPq and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) by financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.carbpol.2015.08.042.

References

Ahmad, H., Nurunnabi, M., Rahman, M. M., Kumar, K., Tauer, K., Minami, H., et al. (2014). Magnetically doped multi stimuli-responsive hydrogel microspheres with IPN structure and application in dye removal. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *459*, 39–47.

Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research*, *6*, 105–121.

Albuquerque, P. B. S., Barros, W., Jr., Santos, G. R. C., Correia, M. T. S., Mourão, P. A. S., Teixeira, J. A., et al. (2014). Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. *Carbohydrate Polymers*, *104*, 127–134.

Assaad, E., Maire, M., & Lerouge, S. (2015). Injectable thermosensitive chitosan hydrogels with controlledgelation kinetics and enhanced mechanical resistance. *Carbohydrate Polymers*, *130*, 87–96.

Bhattacharyya, R., & Ray, S. K. (2014). Enhanced adsorption of synthetic dyes from aqueous solution by a semi-interpenetrating network hydrogel based on starch. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *20*, 3714–3725.

Bosco, M., Segre, A., Miertus, S., Cesa'ro, A., & Paoletti, S. (2005). The disordered conformation of κ-carrageenan in solution as determined by NMR experiments and molecular modeling. *Carbohydrate Research*, *340*, 943–958.

Cheng, Y., He, C., Ding, J., Xiao, C., Zhuang, X., & Chen, X. (2013). Thermosensitive hydrogels based on polypeptides for localized and sustained delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, *34*, 10338–10347.

Cuggino, J. C., Igarzabal, C. A., Rueda, J. C., Quinzani, L. M., Komber, H., & Strumia, M. C. (2008). Synthesis and characterization of new hydrogels through copolymerization of *N*-acryloyl-tris-(hydroxymethyl) aminomethane and different crosslinking agents. *European Polymer Journal*, *44*, 3548–3555.

Da-Lozzo, E. J., Moledo, R. C. A., Faraco, C. D. F., Ortolani-Machado, C. F., Bresolin, T. M. B., & Silveira, J. L. M. (2013). Curcumin/xanthan–galactomannan hydrogels: Rheological analysis and biocompatibility. *Carbohydrate Polymers*, *93*, 279–284.

Dash, R., Foston, M., & Ragauskas, A. J. (2013). Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers. *Carbohydrate Polymers*, *91*, 638–645.

De Cicco, F., Reverchon, E., Adami, R., Auriemma, G., Russo, P., Calabrese, E. C., et al. (2014). In situ forming antibacterial dextran blend hydrogel for wound dressing: SAA technology vs. spray drying. *Carbohydrate Polymers*, *101*, 1216–1224.

Diao, M., Li, Q., Xiao, H., Duan, N., & Xu, J. (2014). Synthesis and adsorption properties of superabsorbent hydrogel and peanut hull composite. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *2*, 1558–1567.

Dima, C., Cotârlet, M., Alexe, P., & Dima, S. (2014). Reprint of "microencapsulation of essential oil of pimento [Pimenta dioica (L) Merr.] by

chitosan/k-carrageenan complex coacervation method". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *25*, 97–105.
Farias, E. H. C., Pomin, V. H., Valente, A. P., Nader, H., Rocha, H. A. O., & Mourao, P. A. S. (2008). A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. *Glycobiology (Oxford)*, *18*, 250–259.
Feyzkhanova, G. U., Filippova, M. A., Talibov, V. O., Dementieva, E. I., Maslennikov, V. V., Reznikov, Yu. P., et al. (2014). Development of hydrogel biochip for in vitro allergy diagnostics. *Journal of Immunological Methods*, *406*, 51–57.
Hennink, W. E., & van Nostrum, C. F. (2002). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *54*, 13–36.
Huang, Y., He, K., & Wang, X. (2013). Rapid prototyping of a hybrid hierarchical polyurethane-cell/hydrogel construct for regenerative medicine. *Materials Science and Engineering C*, *33*, 3220–3229.
Hyum, K., Kim, S. H., Ahn, K. H., & Lee, S. J. (2002). Large amplitude oscillatory shear as a way to classify the complex fluids. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, *107*, 51–65.
Jang, J., Seol, Y.-J., Kim, H. J., Kundu, J., Kim, S. W., & Cho, D.-W. (2014). Effects of alginate hydrogel cross-linking density on mechanical and biological behaviors for tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *37*, 69–77.
Kenawy, R., Kamoun, E. A., Mohy Eldin, M. S., & El-Meligy, M. A. (2014). Physically crosslinked poly(vinyl alcohol)-hydroxyethyl starch blend hydrogel membranes: Synthesis and characterization for biomedical applications. *Arabian Journal of Chemistry*, *7*, 372–380.
Laurén, P., Lou, Y. R., Raki, M., Urtti, A., Bergström, K., & Ylipertula, M. (2014). Technetium-99 m-labeled nanofibrillar cellulose hydrogel for in vivo drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *65*, 79–88.
Lefnaoui, S., & Moulai-Mostefa, N. (2014). Investigation and optimization of formulation factors of a hydrogel network based on kappa carrageenan–pregelatinized starch blend using an experimental design. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *458*, 117–125.
Li, Y., & Shimizu, H. (2006). Morphological investigations on the nanostructured poly(vinylidene fluoride)/polyamide 11 blends by high-shear processing. *European Polymer Journal*, *42*, 3202–3211.
Liu, L., Zhai, J., Zhu, C., Gao, Y., Wang, Y., Han, Y., et al. (2015). One-pot synthesis of 3-dimensional reduced graphene oxide-based hydrogel as support for microbe immobilization and BOD biosensor preparation. *Biosensors and Bioelectronics*, *63*, 483–489.
Liu, Y., Yu, S., Wu, H., Li, Y., Wang, S., Tian, Z., et al. (2014). High permeability hydrogel membranes of chitosan/poly ether-block-amide blends for CO_2 separation. *Journal of Membrane Science*, *469*, 198–208.
Lombardi, S. C., & Mercê, A. L. (2003). Properties of complexes of galactomannan of *Leucaena leucocephala* and Al^{3+}, Cu^{2+} and Pb^{2+}. *Bioresource Technology*, *89*, 63–73.
Lv, Z., Chang, L., Long, X., Liu, J., Xiang, Y., Liu, J., et al. (2014). Thermosensitive in situ hydrogel based on the hybrid of hyaluronic acid and modified PCL/PEG triblock copolymer. *Carbohydrate Polymers*, *108*, 26–33.
Manjanna, K. M., Pramod Kumar, T. M., & Shivakumar, B. (2010). Natural polysaccharide hydrogels as novel excipients for modified drug delivery systems: A review. *International Journal of ChemTech Research*, *2*, 509–525.
Martins, J. T., Cerqueira, M. A., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Souza, B. W. S., & Vicente, A. A. (2012). Synergistic effects between κ-carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. *Food Hydrocolloids*, *29*, 280–289.
Muhamad, I. I., Fen, L. S., Hui, H. Ng., & Mustapha, N. A. (2011). Genipin-cross-linked kappa carrageenan/carboxymethyl cellulose beads and effects on beta-carotene release. *Carbohydrate Polymers*, *83*, 1207–1212.
Pinheiro, A. C., Bourbon, A. I., Rocha, C., Ribeiro, C., Maia, J. M., Gonçalves, M. P., et al. (2011). Rheological characterization of κ-carrageenan/galactomannan and xanthan/galactomannan gels: Comparison of galactomannans from non-traditional sources with conventional galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, *83*, 392–399.
Prajapati, V. D., Jani, G. K., Moradiya, N. G., Randeria, N. P., Nagar, B. J., Naikwadi, N. N., et al. (2013). Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, *60*, 83–92.
Prajapati, V. D., Maheriya, P. M., Jani, G. K., & Solanki, H. K. (2014). Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate Polymers*, *105*, 97–112.
Sandolo, C., Matricardi, P., Alhaique, F., & Coviello, T. (2007). Dynamo-mechanical and rheological characterization of guar gum hydrogels. *European Polymer Journal*, *43*, 3355–3367.
Segura, J. H., Camargo Junior, F. B., Bagatin, E., & Campos, P. M. B. G. M. (2010). Influência da água termal e de seus oligoelementos na estabilidade e eficácia de formulações dermocosméticas. *Surgical & Cosmetic Dermatology*, *2*, 7–11.
Shapiro, Y. E. (2011). Structure and dynamics of hydrogels and organogels: An NMR spectroscopy approach. *Progress in Polymer Science*, *36*, 1184–1253.
Silva, W. A., Pereira, J., Carvalho, C. W. P., & Ferrua, F. Q. (2007). Determinação da cor, imagem superficial topográfica e ângulo de contato de biofilmes de diferentes fontes de amido. *Ciência e Agrotecnologia*, *31*, 154–163.
Soares, P. A. G., Bourbon, A. I., Vicente, A. A., Andrade, C. A. S., Barros, W., Jr., Correia, M. T. S., et al. (2014). Development and characterization of hydrogels based on natural polysaccharides: Policaju and chitosan. *Materials Science and Engineering C*, *42*, 219–226.
Tovar, A. M. F., Capillé, N. V. M., Santos, G. R. C., Vairo, B. C., Oliveira, S-N. M. C. G., Fonseca, R. J. C., et al. (2012). Heparin from bovine intestinal mucosa: Gly-cans with multiple sulfation patterns and anticoagulant effects. *Thrombosis and Haemostasis*, *107*, 903–915.
Vanderzant, C., & Splittstoesser, D. F. (1992). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (3rd ed., pp. 1219). Washington: American Public Health Association (APHA).
Varghese, J. S., Chellappa, N., & Fathima, N. N. (2014). Gelatin–carrageenan hydrogels: Role of pore size distribution on drug delivery process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *113*, 346–351.
Vudjung, C., Chaisuwan, U., Pangan, U., Chaipugdee, N., Boonyod, S., Santawitee, O., et al. (2014). Effect of natural rubber contents on biodegradation and water absorption of Interpenetrating Polymer Network (IPN) hydrogel from natural rubber and cassava starch. *Energy Procedia*, *56*, 255–263.
Yao, Z., Wu, H., Zhang, S., & Du, Y. (2014). Enzymatic preparation of κ-carrageenan oligosaccharides and theiranti-angiogenic activity. *Carbohydrate Polymers*, *101*, 359–367.
Zhang, Z., Ni, J., Chen, L., Yu, L., Xu, J., & Ding, J. (2011). Biodegradable and thermoreversible PCLA-PEG-PCLA hydrogel as a barrier for prevention of post-operative adhesion. *Biomaterials*, *32*, 4725–4736.

ARTIGO III **- ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERÍODICO JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE**

ISSN: 1573-4838

IMPACT FACTOR: 2.379

Wound healing activity of bromelain incorporated in a hydrogel matrix composed of natural polysaccharides.

Wound healing activity of bromelain incorporated in a hydrogel matrix composed of natural polysaccharides

Paulo A.G. Soares[a,b], Priscilla B.S. Albuquerque[a,b], Adelmo C. Aragão-Neto[a,b], Giwellington S. Albuquerque[c], Maria H.M. Lima-Ribeiro[b], Jacinto C. Silva-Neto[c], Maria T.S. Correia[a], Maria G. Carneiro-da-Cunha[a,b*]

[a] Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária - CEP: 50670-420 - Recife, PE - Brazil.

[b] Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Campus Universitário, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brazil

[c] Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária - CEP: 50670-420 - Recife, PE - Brazil.]

(*) Corresponding author: Phone: +55.81.21268547; Fax: +55.81.21268576

E-mail address: mgcc1954@gmail.com (M.G. Carneiro-da-Cunha)

Abstract

The application of bromelain as a topical wound healing compound has been difficult to be managed because of its instability. Although it has beneficial properties for wound healing process, the use of bromelain for a long time of application, without losing its activity, is still a challenge. Healing enhancement and pain control are critical issues on wound management. So far, different wound dressings have been developed. Among them, hydrogels are the most applied. Herein, a hydrogel composed of galactomannan and κ-carrageenan was produced for the incorporation of bromelain. The performance of the hydrogel with or without bromelain in the wound healing process was evaluated through in vivo assays, during 14 days. The attained results revealed that hydrogel, alone, improved the healing, however the incorporation of bromelain in its matrix accelerated and up-regulated this process contributing with a no scar healing. These results demonstrated that the incorporation of bromelain into the galactomannan/κ-carrageenan hydrogel can be used in cutaneous dressing applications for wound healing.

Key-words: bromelain, hydrogel, galactomannan, κ-carrageenan, wound healing.

1. Introduction

Wound healing is one of the most complex biological processes of cellular and biochemical events involving inflammation, migration and proliferation of different types of cells and extracellular matrix (ECM) proteins to restore tissue integrity and homeostasis. For wound treatments, dressings have been developed for centuries to prevent further injury and bacterial invasion, but nowadays their design has evolved toward multi functionalities to better control potential infections and to accelerate the healing process [1,2]. In this segment, hydrogels cover a large segment due to their well-recognized biocompatibility and the capacity to absorb the exuding liquids and debris from the wound area. They can act as a three-dimensional scaffold for tissue engineering or as a water-controlled system for drug delivery [3-5].

Synthetic polymers are often used to obtaining hydrogels due to reproducibility and its chemical properties, such as molar mass and specific control of the crosslink density among the polymer chains. These properties determine the dynamics of the formation of the hydrogel matrix and also determine their mechanical and degradation properties. However, synthetic polymers, from a biological point of view, often do not have a desired bioactivity and cellular biocompatibility, which can translate into adverse side effects. On the other hand, natural polymers, as polysaccharides, are plentiful and more similar to components present in the biological ECM and can be readily accepted by the body, since mostly exhibit high bioactivity and biocompatibility [6].

Galactomannans are a widespread polysaccharide commonly extracted from the endosperm of numerous seed plants (particularly the *Leguminosae*) and have a core constituted with 4-linked β-D-mannopyranose with a repetitive single branch of α-D-galactopyranosyl units linked to position 6 of the central chain [7]. Due to its high molecular weight, water solubility, non-ionic character, biocompatibility and gel properties in higher concentrations, this polysaccharide can be used in food, pharmaceutical, biomedical, cosmetic, textile and paper industries, especially as an emulsion stabilizer [8,9]. Kappa-carrageenan (κC) are obtained by alkaline extraction (or by modification of other carrageenans) from red seaweed (*Rhodophycae*) and are composed of alternating residues of 3-linked β-D-galactopyranose-4-sulfate and 4-linked 3,6-anhydro-α-D-galactopyranose residues [9,10]. Due to its high hydrophilicity, mechanical strength, biocompatibility and biodegradability, this polymer has been mostly used in food industry as gelling, stabilizing and thickener agent [11]. Nevertheless it has also been used to reduce or to eliminate toxicity in biomedical applications [12].

Bromelain (EC 3.4.22.4) is the generic name given to the collection of proteases or proteolytic enzymes found in plants of the *Bromeliaceae* family, of which the best known is pineapple [13]. Bromelain has several uses, all based on its proteolytic activity, such as in the food and pharmaceutical industries [14,15]. These enzymes play an important role in the proteolytic remodeling of ECM in many physiological processes, including tissue morphogenesis, tissue repair, angiogenesis and tissue remodeling, reducing bruising, pain and the healing time [16,17]. However, topical application of Bromelain in wounds still is a challenge, because these enzymes are unstable in solution and are subject to inactivation and/or denaturation.

In the present study, we propose a galactomannan/κ-carrageenan hydrogel with enhanced wound healing activity by bromelain incorporation. This hydrogel formulation was evaluated against topical wound in rats and the proteolytic activity was always monitored to confirm if the bromelain still remained active in the hydrogel matrix. Further, the epithelial cell proliferation and differentiation process was immunohistochemically assessed using cytokeratin 14-, and proliferation cell nuclear antigen (PCNA)-specific antibodies. Cytokeratin 14 and PCNA are normally expressed in the basal layer of stratified epithelial cell types for many tissues, including the oral mucosa and epidermis [18,19]. Their expression pattern in the epidermal tissue changes during the re-epithelialization process and can help in the evaluation of the healing process [20,21].

2. Material and methods

2.1. Materials

The pods of *Cassia grandis* (*C. grandis*) were collected at the rural zone of Pernambuco State, in the city of Angelim (Brazil), in July 2011. Ethanol 99.8%, acetone PA, NaCl and phenol were obtained from Vetec Fine Chemicals Ltda. (Brazil). The galactomannan from *C. grandis* seeds was extracted and purified according to the method described by Albuquerque et al. [8]. κ-Carrageenan (κC) and commercial Bromelain from pineapple stem were purchased from Sigma Aldrich (U.S.A.). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cytokeratin 14 (CK14) antibodies from rat were purchased from SANTA CRUZ (U.S.A.). All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Galactomannan/κ-carrageenan hydrogel preparation and bromelain incorporation

Stock solutions of 0.5 % (w/v) of κC and 1.7 % (w/v) of galactomannan were prepared. A known volume of κC was added into a beaker in addition to a known concentration of of 0.2 M of $CaCl_2$. The solution was maintained under magnetic stirring (850 rpm), at 50 °C during 20 min. The addition of $CaCl_2$ [1.0 % (v/v) of the final volume of desired mixture] was necessary to ignite a crosslinking process. After that, a well-known volume of galactomannan, was added into the beaker containing the κC + $CaCl_2$ solution at 1 mL/min flow rate, using a needle syringe (27G). The mixture was left stirring under 850 rpm at 50 ºC, during additional 30 min. The pH of the mixture was adjusted to to 5.0 using a 1 M HCl solution. This final solution, now named hydrogel (H), was sterilized during 20 min in an autoclave. Then, after the hydrogel reach the ambient temperature, the Bromelain (1.0 mg/mL) was added in the solution and left stirring under 100 rpm during 1 hour. The hydrogel (H) and the hydrogel containing bromelain (HB) were stored at 4 °C for further application. The bromelain activity in the HB was monitored along a 21 days-period and determined by the method described by Soares et al. [22].

2.3. Treatment groups and histopathological evaluation

Forty five male rats of the Wistar strain (Rattusnorvegicus) [90-120 day-old, weighing 250- 300 g] were submitted to experimental surgical procedures, being anesthetized intramuscularly with 2 % (w/v) of xylazine hydrochloride and 10 % (w/v) ketamine hydrochloride at 1:1 ratio. The antisepsis of dorsal thoracic region was made using 1 % (w/v) povidone-iodine and 0.9 % (w/v) NaCl sterile solutions. An aseptic dermal wound (Ø = 0.8 cm) was made by skin incision and divulsion of epidermal layer. After the surgery the animals were randomly divided into three groups (n = 15) according to the treatment: (C) Control, 0.1 ml of 0.9% (w/v) NaCl; (H) hydrogel and (HB) hydrogel containing bromelain. The groups H and HB received daily application of 0.1 ml of hydrogel for dressing, and the group C received saline solution of 0.1M NaCl. All animal procedures were in accordance with the Colégio Brasileiro de Experimentação em Animal (COBEA) and the Animal Ethical Committee of the Universidade Federal de Pernambuco approved the experimental protocol nº 23076.027753/2012-26. After surgical procedures, the animals were clinical evaluated daily according to the presence of the following criteria: edema, hyperemia, presence of exudate, crust, detachment and reepithelialization. A visual proof of the wound healing pattern was recorded by taking digital photograph from a constant distance at the indicated time point. The time taken for full re-epithelialization of the wound biopsies was noted, the rate of contraction and surface area was measured by the standard planimetric method, by tracing the wound on transparent graph sheet. The percentage of wound con-traction was calculated using the following formula:

$$\%\ \text{wound contraction} = \frac{[\text{wound area day } 0 - \text{wound area day } (n)]}{\text{wound area day } 0} \times 100$$

where n = number of days (3^{rd}, 7^{th}, 14^{th} day).

Five animals from each group were sacrificed after 3, 7 and 14 days following the surgical procedure, using lethal doses of sodium thiopental (200 mg.Kg-1). Skin fragments are collected with a wide margin (± 1 cm) from the original lesion and stored in 10 % (v/v) formalin, according to Michalany [23]. The histological specimens were included in paraffin and after microtome cut, the sections were stained using hematoxylin-eosine (HE), for cellular observation.

2.4. Immunohistochemical analysis

Serial sections were immunohistochemically processed by the modifications in the method described for Hosoya et al. [24]. The sections were subjected to autoclaving, while immersed in citric acid buffer (pH 6.0), for 15 min at 121°C for antigen retrieval. After standing for 20 min at room temperature, they were treated with 0.3% H_2O_2 in a solution of 0.1 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) for 15 min at room temperature in order to inactivate endogenous peroxidase. They were subsequently pretreated with goat serum for 30 min at room temperature, and then incubated overnight for 18 h with primary antibodies at 4°C. Mouse monoclonal antibodies against rat CK14 (1:200) and rat PCNA (1:400) were employed. The sections were rinsed in PBS and consecutively reacted with biotinylated goat antibody against mouse IgG (secondary antibody). They were then allowed to react with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin. The immune complexes were visualized using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Liquid DAB Substrate kit). The immunostained sections were counter-stained with Mayer's hematoxylin (Lab Vision, CA, USA), dehydrated with xylene and mounted with Entellan® (Merk).

2.5. Statistical analysis

Concerning statistical analysis, were applied the two-way method of analysis of variance (ANOVA). The statistical significance was set at 5 % ($p<0.05$) and the software used for data entry and processing was the Graphpad Prism for Windows, version 5.0 from Graphpad Software, Inc.

3. Results and discussion

3.1. Bromelain stability in galactomannan/κ-carrageenan hydrogel

The stability of incorporated bromelain in the hydrogel was evaluated over the 45 days of storage at 4 ºC in a view to a possible application as a topical wound dressing. On the storage day and on the 1st, 2nd, 4th, 8th, 14th, 21st, 30th and 45th days were collected samples of bromelain solution (in phosphate buffer pH 5.0) and the hydrogel containing bromelain (1.0 mg/mL) for determination of enzymatic activity (Fig.1). A decline of more than 50% of activity was found for the free bromelain in the first twenty days and a continuous decrease was observed until the end of 45 days with a relative activity of 5,93%. On the other hand, only a decline of 11% of activity was found for the incorporated bromelain, and after that remained stable until thirty days with 82,38% of the initial activity.

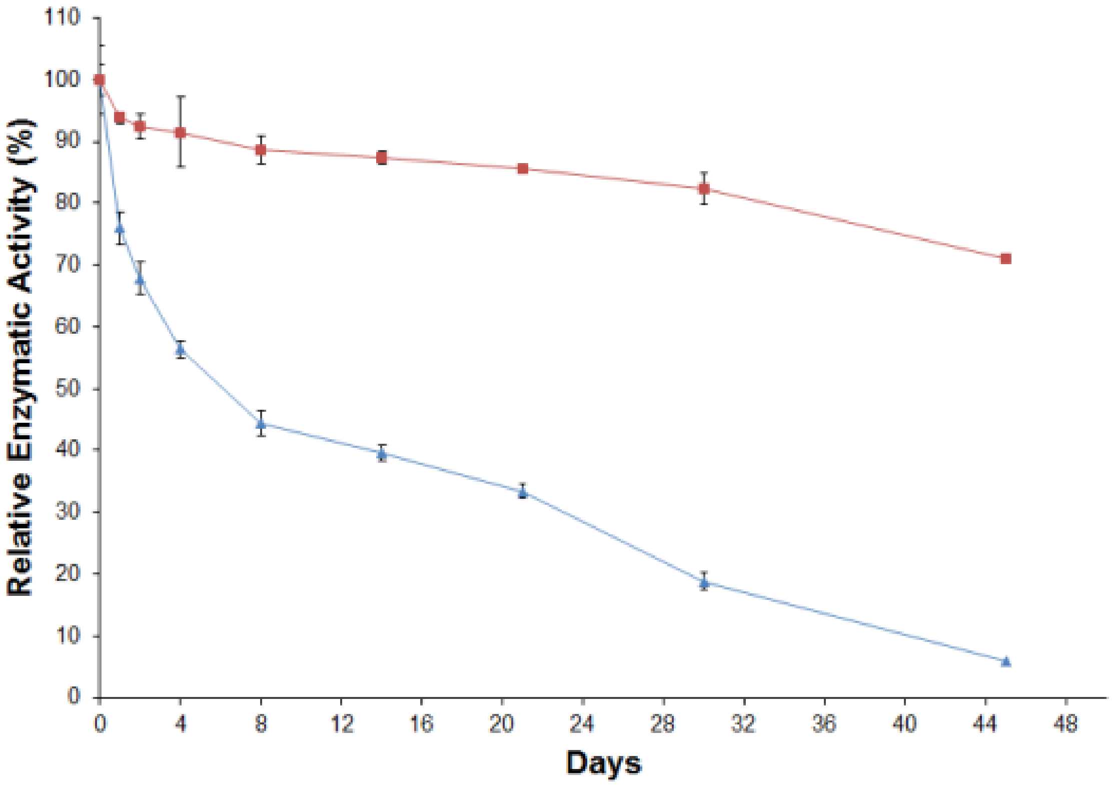


Fig.1. Relative enzymatic activity of free bromelain in phosphate buffer pH 5.0 (▲) and hydrogel containing bromelain (■).Each data point of represents the average of three experiments and the error bars show the standard deviation.

At the end of 45 days, the difference between the free and incorporated bromelain activities was 91,64% of the initial activity. Different synthetic polymers have been utilized in the past years to maintain the bromelain stability along the days under storage at 4 ºC. Bresolin et al. has incorporated bromelain in different dermatological bases, which were stable as its organoleptic characteristics (appearance, color, smell and sensitivity to touch) only when kept at 4 ºC with activity remaining 95.5%, 84,9%, 77.7%, 73.8% and 72.3%, after 90 days of testing in Carbopol gel, Lanette and Chemyunion® cream, and Lanette and Chemyunion® lotion, respectively [25].

Scaffolds made of natural polysaccharides have also been applied to maintain the stability of enzymes. The stability of a trypsin covalently immobilized through a membrane of a cellulosic exopolysaccharide produced by

Zoogloea sp. was evaluated over 54 days by Cavalcante et al. [26], which was found activity retention of 99.12%. Further, Monteiro et al. reported the incorporation of trypsin into a Policaju-Cellulose wound dressing retaining 86% of the enzymatic activity during 28 days of storage at room temperature (25 $\pm$ 3 ºC) [27]. Once more the results found in this work suggest that the incorporation of bromelain in galactomannan/κ-carrageenan hydrogel presented good activity to be used in the wound healing process.

3.2. Rate of wound contracture and macroscopic evaluation

The time taken for the contraction of excisional wounds was calculated from the planimetric sheet photographs using the ImageJ® software program from the wound tracing. The statistical significance between the groups performed using two-way ANOVA and the results showed that the C group was significantly different from H and HB groups on the specified day. Percentages of wound contraction in all groups are shown in Fig.2A. Control group showed the slow rate of wound contraction at various time intervals in post treatment with NaCl 0.15 M. There was a significant increase in the percentage of wound contraction in groups treated with H and HB compared to that of C on all days. However, H and HB treated groups did not show much variation, throughout the study, though HB was marginally better than H. Nevertheless, the healing was much better compared to C. On 14th day of the experiment H and HB treated groups showed same amount of wound contraction with a complete closure.

Regarding clinical observations (Fig.2B), from the first to the third day after surgery, all studied groups presented crust with edema and hyperemia. Further, the C group showed the presence of exudate in the first two days of experiments. The presence of exudate indicates an intense inflammatory response, which means more pain. Comparing the three groups, it was verified that the HB group showed less intense edema and hyperemia in the first three days of experiments. This could be related to the anti-inflammatory activity of bromelain. During the healing hemostatic process, in the first three days of cicatrization, it was verified that bromelain acts reducing the prothrombin and factor X, both required for the activation and conversion of fibrinogen to fibrin via the intrinsic and extrinsic common pathway of the coagulation cascade [28]. Furthermore, bromelain inhibits the generation of bradykinin in inflammatory site through the depletion of plasma kallikrein. These actions results in significant reduction of pain and edema, as well as a better circulation to the injured site [29]. The H group showed no inflammatory exudate in the early days of the healing process because hydrogels can mimics the biological tissues providing some pain relief and they also can used to promote autolytic debridement during the inflammatory stage of wound healing and also be used over granulation tissue to promote re-epithelialization and contraction [30,31].

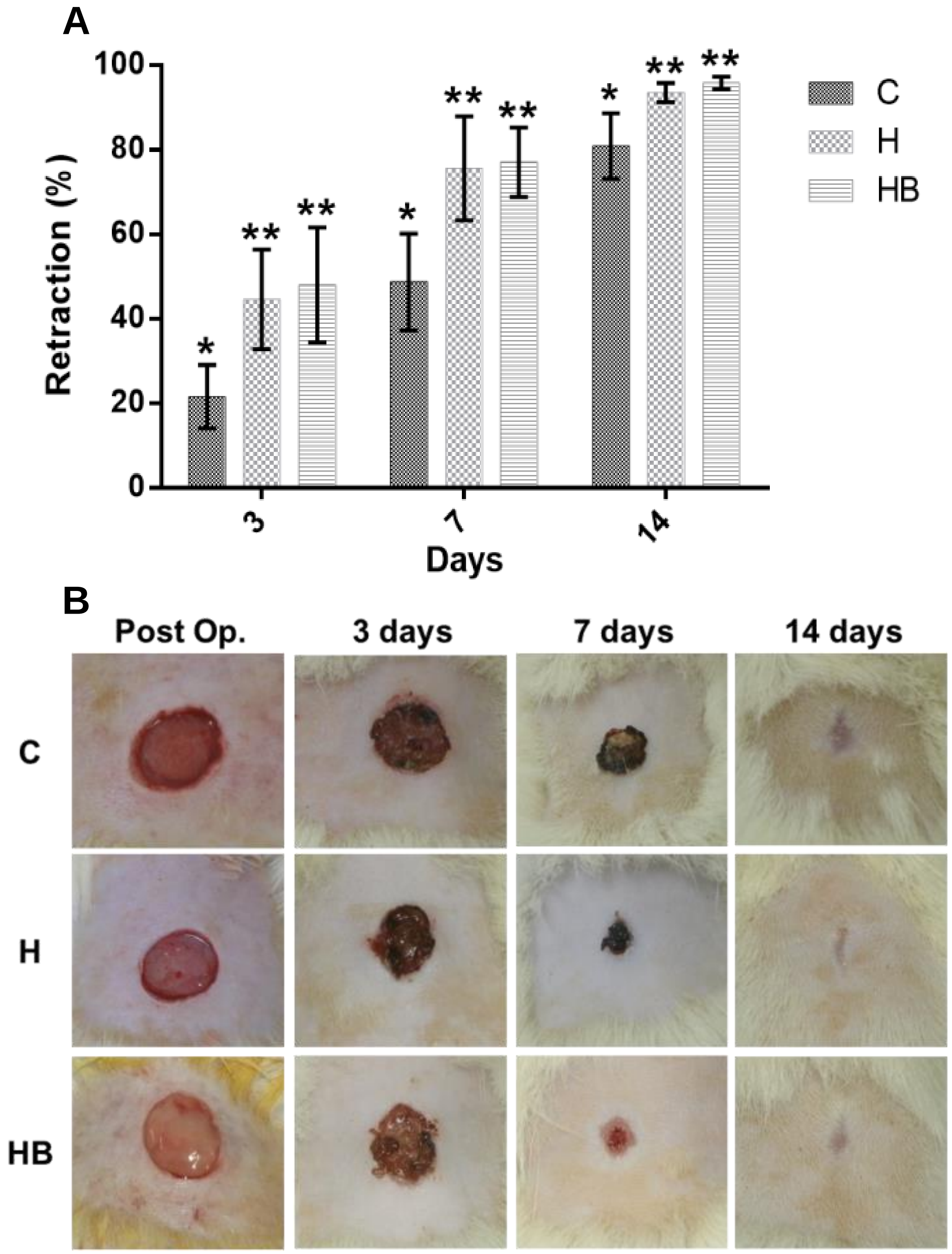


Fig.2. A - Wound area retraction of treated groups: Control (C); Hydrogel (H); Hydrogel containing bromelain (HB). The bars are expressed as mean ± standard error (n = 5). The asterisks represent the significant differences between the C and H/HB groups at the euthanasia day ($p<0.05$). B – Photos showing an example of the healing effect of the hydrogel (H) and the hydrogel containing bromelain (HB) on wound compared with to control (C).

From the 4th to the 6th day, all groups still presented crust with the absent of edema and hyperemia. At the 6th day, the HB group started to lose its crust, characterizing the detachment. From 7th to the 9th day, all groups presented a similar pattern with crust, detachment and re-epithelization. From the 10th to 12th day, only detachment and re-epithelization, and from the 13th to 14th, just re-epithelization. It is important to point that the wounds of HB group were completely closure with 10 days of experiments. The scar tissue formed after the surgical procedure in H and HB groups was much reduced in comparison to C and its coloration was paler and more similar to mature surrounding tissue, evidencing by HB group at 14 days post operatively.

3.3. Histological observations

Histological examination of wound tissues was performed for all control and experimental groups using H&E staining to observe the formation of epithelium, connective tissue, inflammatory response, fibroblast proliferation and collagen deposition. On day 3, H&E stained tissue sections of control and treated groups showed epithelium and connective tissue. The connective tissue has abundance of acute and chronic inflammatory cells such as neutrophils and lymphocytes with blood vessels and extravasated red blood cells (Fig. 3). It was also observed that the polymorphonuclear neutrophils presented in HB group was more intense and distributed to all wound area when compared to C and H group. This intense recruitment is attributed to the bromelain activity incorporated in the galactomannan/κ-carrageenan hydrogel matrix. Physiologically, bromelain can stimulate the release of grown factors as TGF-β, FGF and VEGF, which increase the signalization of mono and polymorphonuclear cells and fibroblasts to the wound area at the hemostasis and anti-inflammatory response of cicatrization process [29].

On 7th day, the H&E stained histopathological sections of H and HB treated wounds showed moderate inflammatory infiltration compared to C wounds, which shows thin epithelium and the connective tissue. The connective tissue is fibrous in nature with less chronic inflammatory cells such as lymphocytes and blood vessels, which clearly indicates that the bromelain incorporated scaffold and the scaffold itself helps in faster healing by preventing the prolonged inflammatory phase. Along with this epithelialization, wound edges were observed to be good for the H and HB treated group. However, in the HB wounds, it was possible to see a new formation of stratified epithelium. These findings clearly showed an advanced healing process.

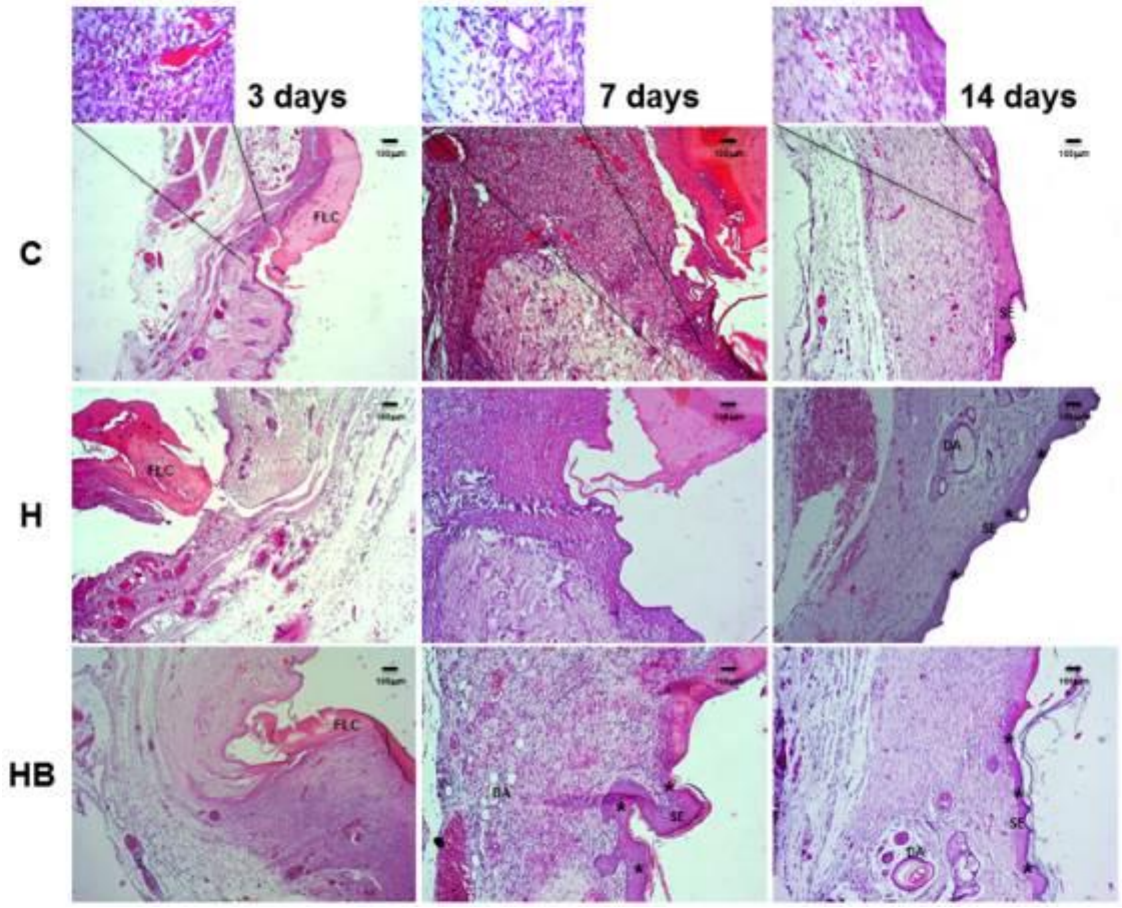


Fig.3. Histological observations of control (C), hydrogel (H) and hydrogel containing bromelain (HB) at 3rd, 7th and 14th day of treatment. FLC: Fibrin Leukocyte Crust; SE: stratified epithelium; DA: dermal annexes (hair follicles and blood vessels); *asterisks*: Epithelial elongation and differentiation. Inserts shows the persistent infiltration of mono and polymorphonuclear in the C wounds (magnification x400). Scale bars: 100 μm.

On 14th day, compared to H and C groups, the HB treated group showed a thicker stratified epithelium and a connective tissue containing more dermal annexes (hair follicles and new blood vessels). The connective tissue is fibrous in nature with dense collagen fibers, H and HB treated groups showed complete epithelialization with focal acanthosis that indicate good and complete healing, whereas, rare epithelialization was seen in C group. Inflammatory cells were present in 3rd, 7th and 14th day sections, but the amount of inflammatory cells were getting reduced showing that the healing process was slow (inserts in Fig3). For C group a defective epithelialization was observed. The collagen deposition and faster epithelial regeneration in the HB treated group could have significantly accelerates wound healing compared with H and C groups. It is well established that the collagen formation is very important for tissue repair and remodeling. Additionally the faster healing and deposition of collagen did not contributed to any scar formation in the wounded areas. These results were better when compared with those *in vivo* experiments with a thermoresponsive chitosan/agarose hydrogel, which was able to heal wounds completely with 21 days [4]. The use of a collagen biocomposite dressing took 17 days to heal wounds completely. However, same results of our work were found when an plant extract with antimicrobial activity was incorporated into this collagen biocomposite, which was able to reduce the heal time to 13 days, with complete closure of wounds [32].

3.4. Immunohistochemical analysis for CK14 and PCNA

Immunohistochemical examination for CK14 and PCNA in the wound tissues was performed for all control and experimental groups using DAB and hematoxylin staining to observe the mobilization of mature cells in the re-epithelization process. Cytokeratins are major intermediate filaments in all types of epithelia and are the most fundamental markers of epithelial differentiation. CK14 is normally expressed in the basal layer of stratified epithelial cell types, including the oral mucosa and epidermis, and its expression pattern in the epidermal tissue, changes during the re-epithelialization process [21,24]. On the 3rd and 7th days no reactivity was observed for CK14 in C and H treated groups, except for the HB group, which showed positive reaction at the basal layer in the border of the wound (Fig.4). These results confirm the faster healing process for HB group as was observed in the histological analysis.

On the 14th day CK14 localization was confined to the basal layer of the epithelium for all groups, however, this immunoreactivity was stronger for HB treated wounds, which show positive results in all layers of the regenerated epithelium, as well as the basal layer surrounding the unwounded epithelium. It was also observed non-specific reaction for CK14 for H group (triangles in Fig.4). This could be explained for the fact that necrotic epithelium and muscles reacted strongly with antibodies for CK14. The same observations were reported in oral wounds during the re-epithelization process of mucosa [24].

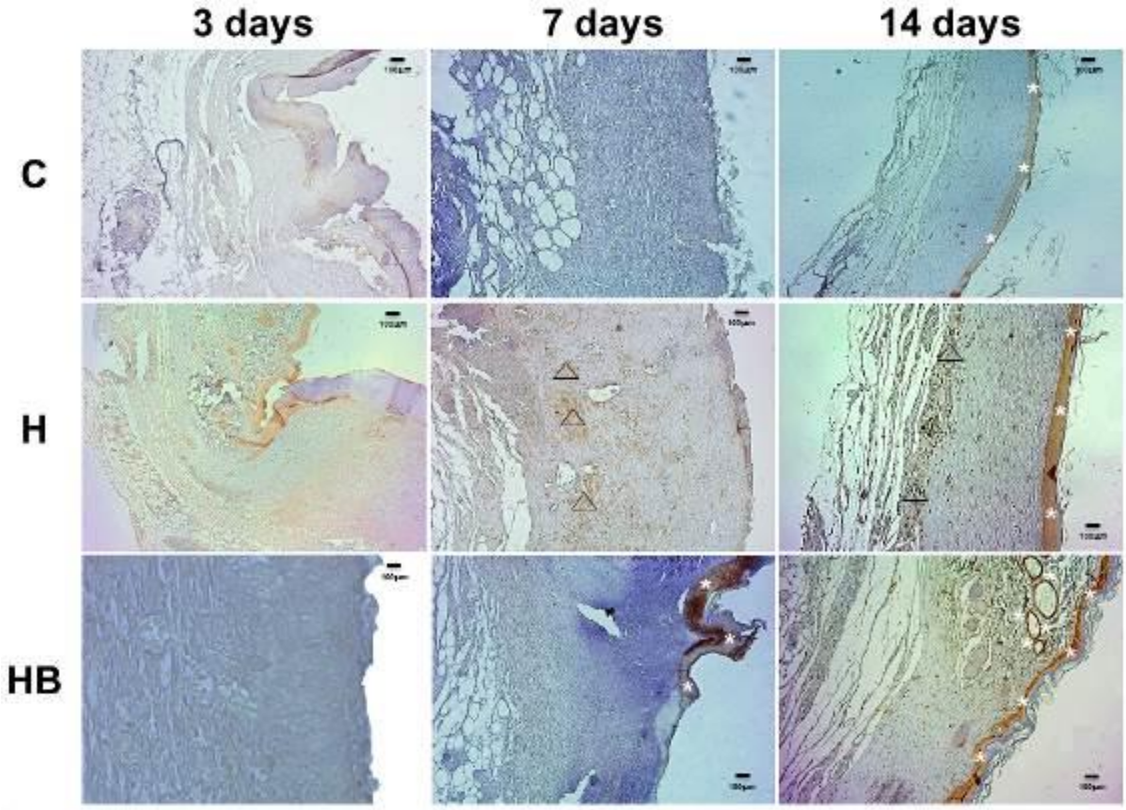


Fig.4. Immunohistochemical observations of cytokeratin 14 in control (C), hydrogel (H) and hydrogel containing bromelain (HB) at 3rd, 7th and 14th day of treatment. DAB and hematoxylin staining. CK14 immunoreactivity (asterisks) is apparent in the regenerated epithelium of HB at 7th day as well as the basal layers unwounded epithelium for all groups at 14th day. Tringles in H at 7th and 14th day show the areas of non-specific reaction for CK14. Scale bars: 100μm.

To explore the cellular mechanisms for the acceleration of wound healing by H and HB treatments, the PCNA expression as a marker of cell proliferation was examined immunohistochemically (data not shown). On 3rd day, the H and HB treated group showed a positive focal reaction at the stromal wounded tissue, being more intense for H group. However, only H treated group showed diffuse reaction for PCNA at basal layer of the surrounding epithelium. No positive reaction was observed for C group. On 7th day of the experiment, the HB treated group showed a focal response in both stromal tissue and basal layer of the forming epithelium, while the H treated group showed a diffuse response. The C group started to show a diffuse response, but moderated, at the stromal wounded tissue. It is known that bromelain can stimulate the conversion of plasminogen to plasmin, resulting in a increasing of the fibrinolysis. This can minimize the venous stasis, facilitating the cleaning, permeability, the recruitment of grown factors and fibroblasts and continuity of the forming epithelium [28].

Comparing the H and HB treated groups, it seems that the bromelain was able to control the cellular differentiation during the healing process. On the 14th day, no reaction was observed for HB treated group. This proves that HB treated wound were completely healed, showing a complete differentiated epithelium. The H treated group still showed a mild focal response at the basal layer of the re-epithelialized tissue and intense diffuse response was observed at the stromal tissue and the basal layer of the re-epithelialized C wounds, which proves that the healing process was not complete. Hence, the use of hydrogel of galactomannan/κ-carrageenan can be effectively used as an alternative dressing for the scar less deep wound healing, but this process can be stimulated and accelerated by the incorporation of bromelain into its matrix.

4. Conclusions

Based on all data collected, the produced galactomannan/κ-carrageenan hydrogel provides an adequate wound healing environment that fulfils the required criteria set forth for an “ideal” wound dressing. In vivo assays proves that this hydrogel, take alone, can contribute to the wound healing, however the incorporation of bromelain into its matrix accelerated and up-regulated this process. Results of the present study demonstrated that the bromelain was incorporated with success in the hydrogel matrix and remained active during 45 days with 82% of its proteolytic activity. The HB treatment has a better wound healing property and has following advantages: (i) it helps in faster wound healing, i.e., in 10 days, (ii) it reduces the inflammation, (iii) it increases the fibroblasts mobilization and collagen deposition and (v) it reduces scar formation. Further, an investigation is necessary to assess the functional roles of growth factors during the wound healing process and how the incorporated bromelain contribute to this event. The system presented in this work can be considered an innovative approach and a practical contribution of advanced solutions for challenging epidermal regenerative processes in compromised situations, as wound of difficult healing of immunocompromised and diabetics.

Acknowledgement

PAGS and GSA authors are recipient of a scholarship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the authors PBSA and ACAN are recipient of a scholarship from the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), MGCC and MTSC express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants and fellowship. The authors acknowledge the Laboratory of Immunopathology Keiso Asami (LIKA) and the Laboratório de Citologia Clínica from Laboratório Central (LabCen/UFPE) by analitical support and CNPq and CAPES by financial support.

References

[1] Dreifke MB, Jayasuriya AA, Jayasuriya AC. Current wound healing procedures and potential care. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2015;48:651–662.

[2] Davidson JR, Current Concepts in Wound Management and Wound Healing Products. Vet Clin Small Anim. 2015;45:537–564.

[3] Lim HP, Tey BT, Chan ES. Particle designs for the stabilization and controlled-delivery of protein drugs by biopolymers: A case study on insulin. J Control Release. 2014;186:11–21.

[4] Miguel SP, Ribeiro MP, Brancal H, Coutinho P, Correia IJ. Thermoresponsive chitosan–agarose hydrogel for skin regeneration. Carbohydr Polym. 2014; 111:366–373.

[5] Hu J, Hou Y, Park H, Choi B, Hou S, Chung A, et al. Visible light crosslinkable chitosan hydrogels for tissue engineering. Acta Biomater. 2012;8:1730–1738.

[6] Kumbar SG, Laurencin CT, Deng M. Natural and Synthetic Biomedical Polymers. 1st ed. Burlington: Elsevier; 2014.

[7] Prajapati VD, Jani GK, Moradiya NG, Randeria NP, Nagar BJ, Naikwadi NN, et al. Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide. Int J Biol Macromol. 2013;60:83– 92.

[8] Albuquerque PBS; Barros Jr W, Santos GRC, Correia MTS, Mourao PAS, Teixeira JA, et al. Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of Cassia grandis. Carbohydr Polym. 2014;104:127–134.

[9] Pinheiro AC, Bourbon AI, Rocha C, Ribeiro C, Maia JM, Gonçalves MP, et al. Rheological characterization of κ-carrageenan/galactomannan and xanthan/galactomannan gels: Comparison of galactomannans from non-traditional sources with conventional galactomannans. Carbohydr Polym. 2011;83:392–399.

[10] Prajapati VD, Maheriya PM, Jani GK, Solanki HK. Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. Carbohydr Polym. 2014;105:97–112.

[11] Dima C, Cotârlet M, Alexe P, Dima S. Microencapsulation of essential oil of pimento [Pimenta dioica (L) Merr.] by chitosan/κ-carrageenan complex coacervation method. Innov Food Sci Emerg. 2014;22:203–211.

[12] Muhamad II, Fen LS, Hui HNg, Mustapha NA. Genipin-cross-linked kappa carrageenan/carboxymethyl cellulose beads and effects on beta-carotene release. Carbohydr Polym, 2011;83:1207–1212.

[13] Murachi, T. Bromelain enzymes. In: Lorand, L. Methods in Enzymology. New York: Academic Press. 1976;45:475-485.

[14] Wu SY, Hu W, Zhang B, Liu S, Wang JM, Wang AM. Bromelain Ameliorates the Wound Microenvironment and Improves the Healing of Firearm Wounds. J Surg Res. 2012;176:503–509.

[15] Chobotova K, Vernallis AB, Majid FAA. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. Cancer Lett. 2010;290:148-156.

[16] Rosenberg L, Krieger Y, Silbersteina E, Arnona O, Sinelnikovb IA, Bogdanov-Berezovsky A, et al. Selectivity of a bromelain based enzymatic debridement agent: A porcine study. Burns. 2012;38:1035–1040.

[17] Rahm DH, Labovitz JM. Perioperative Nutrition and the Use of Nutritional Supplements. Clin Podiatr Med Surg. 2007;24:245–259.

[18] Heyden A, Huitfeldt HS, Koppang HS, Thrane PS, Bryne M, Brandtzaeg P. Cytokeratins as epithelial diVerentiation markers in premalignant and malignant oral lesions. J Oral Pathol Med. 1992;21:7–11.

[19] Pelissier A, Ouhayoun JP, Sawaf MH, Forest N. Changes in cytokeratin expression during the development of the human oral mucosa. J Periodontal Res. 1992;27:588–598.

[20] Watanabe S, Osumi M, Ohnishi T, Ichikawa E, Takahashi H. Changes in cytokeratin expression in epidermal keratinocytes during wound healing. Histochem Cell Biol. 1995;103:425–433.

[21] Kurokawa I, Mizutani H, Kusumoto K, Nishijima S, Tsujita-Kyutoku M, Shikata N, et al. Cytokeratin, Wlaggrin, and p63 expression in reepithelialization during human cutaneous wound healing. Wound Repair Regen. 2006;14:38–45.

[22] Soares PAG, Vaz AFM, Correia MTS, Pessoa Jr. A, Carneiro-da-Cunha MG. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. Sep Purif Technol. 2012;98:389–395.

[23] Michalany J. Anatomia patológica. São Paulo: Lemos; 2005.

[24] Hosoya A, Lee J-M, Cho S-W, Kim J-Y, Shinozaki N, Shibahara T, et al. Morphological evidence of basal keratinocyte migration during the re-epithelialization process. Histochem Cell Biol. 2008;130:1165–1175.

[25] Bresolin IRAP, Bresolin ITL, Mazzola PG, Tambourgi EB. Incorporation of Bromelain into Dermatological Bases: Accelerated Stability Studies. J Chem Chem Eng. 2014;8:270-277.

[26] Cavalcante AHM, Carvalho Jr LB, Carneiro-da-Cunha MG. Cellulosic exopolysaccharide produced by Zoogloea sp. as a film support for trypsin immobilisation. Biochem Eng J. 2006;29:258–61.

[27] Monteiro FMF, Silva GMM, Silva JBR, Porto CS, Carvalho Jr. LB, Lima-Filho JL, et al. Immobilization of trypsin on polysaccharide film from Anacardium occidentale L. and its application as cutaneous dressing. Process Biochem. 2007;42,884–888.

[28] Taussig SJ, Batkin S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (Ananas comosus) and its clinical application. An update. J Ethnopharmacol. 1988;22,191-203.

[29] Kelly GS, ND. Bromelain: A Literature Review and Discussion of its Therapeutic Applications. Altern Med Rev. 1996;1,243-257.

[30] Hedlund C. Surgery of the integumentary system. In: Fossum TW, editor. Small animal surgery. 3rd edition. St Louis (MO): Mosby Elsevier; 2007. pp.159–259.

[31] Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston G.M. Woundhealing dressings and drug delivery systems: A review. J Pharm Sci. 2008;97,2892–2923.

[32] Muthukumar T , Anbarasu K, Prakash D, Sastry TP. Effect of growth factors and pro-inflammatory cytokines by thecollagen biocomposite dressing material containing Macrotylomauniflorum plant extract—In vivo wound healing. Colloids Surf B Biointerfaces. 2014;121:178–188.

Figure captions

Fig.1. Relative enzymatic activity of free bromelain in phosphate buffer pH 5.0 (▲) and hydrogel containing bromelain (■).Each data point of represents the average of three experiments and the error bars show the standard deviation.

Fig.2. A - Wound area retraction of treated groups: Control (C); Hydrogel (H); Hydrogel containing bromelain (HB). The bars are expressed as mean $\pm$ standard error (n = 5). The asterisks represent the significant differences between the C and H/HB groups at the euthanasia day ($p<0.05$). B – Photos showing an example of the healing effect of the hydrogel (H) and the hydrogel containing bromelain (HB) on wound compared with to control (C).

Fig.3. Histological observations of control (C), hydrogel (H) and hydrogel containing bromelain (HB) at 3rd, 7th and 14th day of treatment. FLC: Fibrin Leukocyte Crust; SE: stratified epithelium; DA: dermal annexes (hair follicles and blood vessels); *asterisks*: Epithelial elongation and differentiation. Inserts shows the persistent infiltration of mono and polymorphonuclear in the C wounds (magnification x400). Scale bars: 100µm.

Fig.4. Immunohistochemical observations of cytokeratin 14 in control (C), hydrogel (H) and hydrogel containing bromelain (HB) at 3rd, 7th and 14th day of treatment. DAB and hematoxylin staining. CK14 immunoreactivity (asterisks) is apparent in the regenerated epithelium of HB at 7th day as well as the basal layers unwounded epithelium for all groups at 14th day. Tringles in H at 7th and 14th day show the areas of non-specific reaction for CK14. Scale bars: 100µm.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Novos hidrogéis preparados a partir da mistura de dois polissacarídeos naturais foram desenvolvidos com sucesso: hidrogél de policaju/quitosana e hidrogel de galactomanana/κ-carragenana.
- Através de desenhos experimentais estatísticos foi possível determinar as melhores concentrações dos polissacarídeos empregados no desenvolvimento destes hidrogéis.
- As melhores formulações para o hidrogel de policaju/quitosana foram as misturas de 1:4 e 2:3 (policaju:quitosana), enquanto que para o hidrogel galactomanana/k-carragenana a melhor composição foi aquela contendo 1,7% (p/v) de galactomanana, 0,5% (p/v) de κ-carragenana, 0,2 M de $CaCl_2$ no pH 5,0.
- Ambos os hidrogéis foram bem caracterizados macro e microscopicamente quanto ao tipo de matriz formada e quanto os parâmetros reológicos e pelos resultados obtidos através das técnicas de FTIR e RMN foi possível classifica-los como hidrogéis físicos, uma vez que nenhuma ligação convalente entre os polissacarídeos envolvidos foi detectada.
- Os hidrogéis policaju/quitosana 1:4 e 2:3 apresentaram uma matriz interna altamente porosa e características diferentes quanto à resistência a tensão e viscosidade, sendo tais variáveis influenciadas pela concentração de policaju. Quanto maior a concentração de policaju, maior foram os tamanhos dos poros da matriz, maior a capacidade absorvente e menor a resistência à tensão e viscosidade.
- O hidrogel galactomanana/κ-carragenana também apresentou uma matriz porosa, porém mais irregular comparada aos hidrogéis policaju/quitosana. Entretando, comparado aos hidrogéis policaju/quitosana, o hidrogel galactomanana/κ-carragenana apresentou melhores características reológicas de resistência à tensão e maior viscosidade, além de uma natureza elástica preponderante. Além disso, para uma aplicação a longo prazo, o hidrogel galactomanana/κ-carragenana parece ser o mais adequado.

- Com base nas características e propriedades físicas apresentadas, bem como nas propriedades biológicas dos polissacarídeos envolvidos, os hidrogéis policaju/quitosana e galactomanana/k-carragenana podem ser bem aplicados pelas indústrias biomédica, cosmética e farmacêutica como matrizes para a incorporação e liberação controlada de biomoléculas, suporte celular para a engenharia de tecidos e curativos para cicatrização de feridas.
- O impacto na cicatrização de lesões cutâneas em ratos demonstrou que os hidrogéis policaju/quitosana 1:4 (Registro de Patente nº BR 10 2014 014009-3) e galactomanana/κ-carragenana demonstrou que os mesmos contribuíram para um processo de cura e modulação da inflamação mais eficiente.
- A incorporação de bromelina no hidrogel galactomanana/κ-carragenana acelerou de forma controlada o processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, permitindo uma cura mais rápida (10 dias), redução da inflamação, aumento da mobilização de fibroblastos e deposição de colagénio e redução da formação de cicatriz.
- Os sistemas apresentados neste trabalho podem ser considerados uma abordagem inovadora e uma contribuição prática de soluções avançadas para desafiar processos regenerativos epidérmicos em situações comprometidas, como nas feridas de difícil cicatrização de pacientes imunodeprimidos e diabéticos.

REFERÊNCIAS

ABDAL-HAY, A., OH, Y.S., YOUSEF, A., PANT, H.R., VANEGAS, P. & LIM, J.K. (2014) . In Vitro Deposition of Ca-P Nanoparticles on Air Jet Spinning Nylon 6 Nanofibers Scaffold For Bone Tissue Engineering. *Applied Surface Science*, 307, 69–76.

ABDULKARIM, A., ISA, M.T., ABDULSALAM, S., MUHAMMAD, A.J. & AMEH, A.O. (2013). Extraction and characterisation of chitin and chitosan from mussel shell. *Civiland Environmental Research*, 3, 108–114.

ABDULKHANI, A., HOSSEINZADEH, J., ASHORI, A., DADASHI, S. & TAKZARE, Z. (2014). Preparation and characterization of modified cellulose nanofibers reinforced polylactic acid nanocomposite. *Polymer Testing*, 35, 73–79.

ABREU, F.O.M.S., OLIVEIRA, E.F., PAULA, H.C.B. & DE PAULA, R.C.M. (2012). Chitosan/Cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 89, 1277–1282.

AHMED, E.M. (2013). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. Journal of Advanced Research, *in press*: http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006.

AKINPELU, D.A. (2001) Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. *Fitoterapia*, 72, 286- 287.

ALBANI, S.M.F., DA SILVA, M.R., FRATELLI, F., JUNIOR, C.P.C., IOURTOV, D., CINTRA, F.O., TAKAGI, M. & CABRERA-CRESPO, J. (2015). Polysaccharide purification from *Haemophilus influenzae* type b through tangential microfiltration. *Carbohydrate Polymers*, 116, 67–73.

ALBUQUERQUE, P.B.S.; BARROS JR. W.; SANTOS, G.R.C.; CORREIA, M.T.S.; MOURAO, P.A.S.; TEIXEIRA, J.A. & CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. (2014). Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of Cassia grandis. *Carbohydrate Polymers*, 104, 127–134.

ALSHEMARY, A.Z., GOH, Y.-F., SHAKIR, I. & HUSSAIN, R. (2015). Synthesis, characterization and optical properties of chromium doped β-Tricalcium phosphate. *Ceramics International*, 41, 1663–1669.

ANDERSON D.M.W. & BELL P.C. (1975). Structural analysis of the gum polysaccharides from *Anacardium occidentale*, in: Uronic acid materials 48. *Analytica Chimica Acta*, 79, 185-197.

ANDRADE, C.T., AZERO, E.G., LUCIANO, L. & GONÇALVES, M.P. (2000). Rheological properties of mixtures of κ-carrageenan from *Hypnea musciformis* and galactomannan from *Cassia javanica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 349–353.

AOUADA, F.A. (2009). *Síntese e caracterização de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose para a liberação controlada de pesticidas*. Tese (Doutorado em Química). - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo/SP.

ARRUDA, I.R.S., ALBUQUERQUE, P.B.S., SANTOS, G.R.C., SILVA, A.G., MOURÃO, P.A.S., CORREIA, M.T.S., VICENTE, A.A. & CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. (2014). Structure and rheological properties of a xyloglucan extracted from Hymenaea courbaril var. courbaril seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, *in press*: doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.11.001.

ASBIL, C.S. & MACHNIAK, B.B. (2000). Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. *Research Focus*, 3, 35-40.

ASSAAD, E., MAIRE, M. & LEROUGE, S. (2015). Injectable thermosensitive chitosan hydrogels with controlledgelation kinetics and enhanced mechanical resistance. *Carbohydrate Polymers*, 130, 87–96.

BALAKRISHNAN, B., MOHANTY, M., UMASHANKAR, P. & JAYAKRISHNAN, A. (2005). Evaluationof an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate andgelatin. *Biomaterials*, 26, 6335–6342.

BARRA, G. *Fundamentos da Reologia de Materiais Poliméricos. Apostila de processos 4*. EMC 5744. Disponível em: http://emc5744.barra.prof.ufsc.br/Reologia%20parte%201.pdf. Acessado em: 20/11/2014.

BHATTACHARYYA, R. & RAY, S.K. (2014). Enhanced adsorption of synthetic dyes from aqueous solution by a semi-interpenetrating network hydrogel based on starch. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20, 3714–3725.

BIOMATERIALS MARKET [By Products (Polymers, Metals, Ceramics, Natural Biomaterials) & Applications (Cardiovascular, Orthopedic, Dental, Plastic Surgery, Wound Healing, Tissue Engineering, Ophthalmology, Neurology Disorders)] – Global Forecasts to 2017. Em: http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biomaterials-393.html. Acessado em: 20/11/2014.

BOATENG, J.S., MATTHEWS, K.H., STEVENS, H.N. & ECCLESTON, G.M. (2008). Woundhealing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 2892–2923.

BURITI, F.C.A., FREITAS, S.C., EGITO, A.S. & DOS SANTOS, K.M.O. (2014). Effects of tropical fruit pulps and partially hydrolysed galactomannan from Caesalpinia pulcherrima seeds on the dietary fibre content, probiotic viability, texture and sensory features of goat dairy beverages. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 196-203.

BUWALDA, S.J., BOERE, K.W.M., DIJKSTRA, P.J., FEIJEN, J., VERMONDEN, T. & HENNINK, W.E. (2014). Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *Journal of Controlled Release*, 190, 254–273.

CAMPO, V.L., KAWANO, D.F., DA SILVA, D.B. & CARVALHO, I. (2009). Carrageenans: Bio-logical properties, chemical modifications and structural analysis. *CarbohydratePolymers*, 77, 167–180.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G., CERQUEIRA, M.A., SOUZA, B.W.S., TEIXEIRA, J.A. & VICENTE, A.A. (2011). Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential andmean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multinanolayered films production. *Carbohydrate Polymers*, 85, 522–528.

CERQUEIRA, M.A.; BOURBON, A.I.; PINHEIRO, A.C.; MARTINS, J.T.; SOUZA, B.W.S.; TEIXEIRA, J.A. & VICENTE, A.A. (2011). Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 662-671.

CERQUEIRA, M.A.; LIMA, A.M.; TEIXEIRA, J.A.; MOREIRA, R.A. & VICENTE, A.A. (2009). Suitability of novel galactomannans as edible coatings for tropical fruits. *Journal of Food Engineering,* 94, 372-378.

CHAN, Z., WEI, L., WENZHE, C., XIAOYUN, Y., SHUGUANG, C. & XUEQING, X. (2014). Microstructure and optical limiting properties of multicomponent inorganic gel-glasses: A focus on SiO_2, TiO_2 and PbO gel-glasses. *Ceramics International*, 40, 2669–2675.

CHANG, C., DUAN, B., CAI, J. & ZHANG, L. (2010). Superabsorbent hydrogels based on cellulose for smart swelling and controllable delivery. *European Polymer Journal*, 46, 92–100.

CHEN, F., PENG, J., LEI, D., LIU, J. & ZHAO, G.. (2013). Optimization of genistein solubilization by κ-carrageenan hydrogel using response surface methodology. *Food Science and Human Wellness*, 2, 124–131.

CHEN, P., TAO, J., ZHU, S., CAI, Y., MAO, Q., YU, D., DAI, J. & OUYANG, H. (2015). Radially oriented collagen scaffold with SDF-1 promotes osteochondral repair by facilitating cell homing. *Biomaterials*, 39, 114-123.

CHEN, Q. & THOUAS, G.A. (2015). Metallic implant biomaterials. *Materials Science and Engineering R*, 87, 1–57.

CHEN, Y., LIAO, M.L. & DUSTAN, D.E. (2002). The rheology of K^+-κ-carrageenan as aweak gel. *Carbohydrate Polymers*, 50, 109–116.

CHEVALLAY, B. & HERBAGE, D. (2000). Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 38, 211–218.

CHOBOTOVA, K.; VERNALLIS, A.B. & MAJID, F.A.A. (2010). Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. *Cancer Letters*, 290, 148-156.

CHOPIN, T. & WHALEN, E. (1993). A new and rapid method for carrageenan identification by FTIR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. *Carbohydrate Research*, 246, 51-59.

COE, F.G. & ANDERSON, G.J.. (1996). Ethnobotany of the Garifuna of Eastern Nicaragua. *Economic Botany*, 50, 71–108.

COLQUHOUN, I.J., JAY, A.J., EAGLES, J., MORRIS, V.J., EDWARDS, K.J., GRIFFIN, A.M. & GASSON, M.J. (2001). Structure and conformation of a novel genetically engineered polysaccharide P2. *Carbohydrate Research*, 330, 325–333.

COVIELLO, T., MATRICARDI, P., MARIANECCI, C. & ALHAIQUE, F. (2007). Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release*, 119, 5-24.

COX, S.C., THORNBY, J.A., GIBBONS, G.J., WILLIAMS, M.A. & MALLICK, K.K. (2015). 3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C*, 47, 237–247.

CUGGINO, J.C., IGARZABAL, C.A., RUEDA, J.C., QUINZANI, L.M., KOMBER, H. & STRUMIA, M.C. (2008). Synthesis and characterization of new hydrogels through copolymerization of N-acryloyl-tris-(hydroxymethyl) aminomethane and different crosslinking agents. *European Polymer Journal*, 44, 3548–3555.

D'AYALA, G.G., MALINCONICO, M. & LAURIENZO, P. (2008). Marine derived polysaccha-rides for biomedical applications: Chemical modification approaches. *Molecules*,13, 2069–2106.

DA-LOZZO, E.J., MOLEDO, R.C.A., FARACO, C.D.F., ORTOLANI-MACHADO, C.F., BRESOLIN, T.M.B. & SILVEIRA, J.L.M. (2013). Curcumin/xanthan–galactomannan hydrogels: Rheological analysis and biocompatibility. *Carbohydrate Polymers*, 93, 279– 284.

DASH, R., FOSTON, M. & RAGAUSKAS, A.J. (2013). Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers. *Carbohydrate Polymers*, 91, 638–645.

DE PAULA R.C.M. & RODRIQUES J.F. (1995). Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale L. Carbohydrate Polymers*, 26, 177-181.

DELGADO, A.V., GONZÁLES-CABALLERO, F., HUNTER, R.J., KOOPAL, L.K. & LYKLEMA, J. (2005). Measurement and Interpretation of Electrokinetic Phenomena (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 77, 1753–1805.

DIAO, M., LI, Q., XIAO, H., DUAN, N. & XU, J. (2014). Synthesis and adsorption properties of superabsorbent hydrogel and peanut hull composite. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2, 1558–1567.

DIMA, C., COTÂRLET, M., ALEXE, P. & DIMA, S. (2014). Microencapsulation of essential oil of pimento [Pimenta dioica (L) Merr.] by chitosan/κ-carrageenan complex coacervation method. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 22, 203–211.

DINIS, T.M., ELIA, R., VIDAL, G., DERMIGNY, Q., DENOEUD, C., KAPLAN, D.L., EGLES, C. & MARIN, F. (2015). 3D multi-channel bi-functionalized silk electrospun conduits for peripheral nerve regeneration. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 41, 43–55.

ELLURU, M., MA, H., HADJIARGYROU, M., HSIAO, B.S. & CHU, B. (2013). Synthesis and characterization of biocompatible hydrogel using Pluronics-based block copolymers. *Polymer*, 54, 2088–2095.

FAO. (2007). *FAO JECFA Monographs 4. Specifications: Carrageenan*. Disponível em: http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/details.html?id=830. Acessado em: 20/11/2014.

FARKISH, A. & FALL, M. (2013). Rapid dewatering of oil sand mature fine tailings using super absorbent polymer (SAP). *Minerals Engineering*, 50–51, 38–47.

FLORÊNCIO A.P.S., MELO, J.H.L., MOTA C.R.F.C., MELO-JÚNIOR, M.R. & ARAÚJO R.V.S. (2007). Estudo da atividade anti-tumoral do polissacarídeo (pju) extraído de *Anacardium occidentale* frente a um modelo experimental do sarcoma 180**.** *Revista Eletrônica de Farmácia*, 4, 61-65.

GAOWA, A., HORIBE, T., KOHNO, M., SATO, K., HARADA, H., HIRAOKA, M., TABATA, Y. & KAWAKAMI, K. (2014). Combination of hybrid peptide with biodegradable gelatin hydrogel for controlled release and enhancement of anti-tumor activity *in vivo*. *Journal of Controlled Release*, 176, 1–7.

GARCÍA-PÁEZ, I.H., CARRODEGUAS, R.G., DE AZA, A.H., BAUDÍN, C. & PENA, P. (2014). Effect of Mg and Si co-substitution on microstructure and strength of tricalcium phosphate ceramics. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 30, 1–15.

GAVHANE, Y.N., GURAV ATUL, S. & YADAV ADHIKRAO, V. (2013). Chitosan and its applica-tions: A review of literature. International *Journal of Research in Pharmaceuticaland Biomedical Sciences*, 4, 312–332.

GENTILE, G., GRECO, F. & LAROBINA, D. (2013). Stress-relaxation behavior of a physical gel: Evidence of co-occurrence of structural relaxation and water diffusion in ionic alginate gels. *European Polymer Journal*, 49, 3929–3936.

GIDLEY, M.J. & REID, J.S.G. (2006). *Food polysaccharides and their applications. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds*. 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton.

GIRON, L.M., FREIRE, V., ALONZO, A. & CACERES, A. (1991). Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*, 34, 173–187.

GOLDSTEIN, J.I., NEWBURY, D.E., JOY, D.C., LYMAN, C.E., ECHLIN, P., LIFSHIN, E., SAWYER, L. & MICHAEL, J.R. (2003). *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. 3rd ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C., GIMÉNEZ, B., LÓPEZ-CABALLERO, M.E. & MONTERO, M.P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25, 1813-1827.

GRAVELLE, A.J., BARBUT, S., QUINTON, M. & MARANGONI, A.G. (2014). Towards the development of a predictive model of the formulation-dependent mechanical behaviour of edible oil-based ethylcellulose oleogels. *Journal of Food Engineering*, 143, 114–122.

GREENWOOD, R. & KENDALL, K. (1999). Selection of Suitable Dispersants for Aqueous Suspensions of Zirconia and Titania Powders using Acoustophoresis. *Journal of the European Ceramic Society*, 19, 479–488.

GRIFfiN, J.S., MILLS, D.H., CLEARY, M., NELSON, R., MANNO, V.P. & HODES, M. (2014). Continuous extraction rate measurements during supercritical CO_2 drying of silica alcogel. *The Journal of Supercritical Fluids*, 94, 38–47.

GUILHERME, M.R., REISA, A.V., TAKAHASHIA, S.H., RUBIRA, A.F., FEITOSA, J.P.A. & MUNIZ, E.C. (2005). Synthesis of a novel superabsorbent hydrogel by copolymerization of acrylamide and cashew gum modified with glycidyl methacrylate. *Carbohydrate Polymers*, 61, 464–471.

GUO, S., MAO, W. LI, Y., GU, Q., CHEN, Y., ZHAO, C., LI, N., WANG, C., GUO, T. & LIU, X. (2013). Preparation, structural characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by the fungus *Oidiodendron truncatum* GW. Process Biochemistry, 48, 539–544.

GUTERRES, S.S., ALVES, M.P. & POHLMANN, A.R. (2007). Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. *Drug Target Insights*, 2, 147-157.

HAN, C.D. (2007). *Rheology and Processing of Polymeric Materials. Vol.1. Polymer Rheology*. Oxford, New York.

HANAOR, D.A.H., MICHELAZZI, M., LEONELLI, C. & SORRELL, C.C. (2012). The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO_2. *Journal of the European Ceramic Society*, 32, 235–244.

HARLEY-TROCHIMCZYK, A., CHANG, J., ZHOU, Q., DONG, J., PHAM, T., WORSLEY, M.A., MABOUDIAN, R., ZETTL, A. & MICKELSON, W. (2015). Catalytic hydrogen sensing using microheated platinum nanoparticle-loaded graphene aerogel. *Sensors and Actuators B*, 206, 399–406.

HENNINK, W.E. & VAN NOSTRUM, C.F. (2002). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 13–36.

HEZAVEH, H. & MUHAMAD, I.I. (2013). Modification and swelling kinetic study of kappa-carrageenan-based hydrogel for controlled release study. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44, 182–191.

HOARE, T.R. & KOHANE, D.S. (2008). Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 49, 1993-2007.

HOFFMAN, A.S. (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 43, 3-12.

HOLEKAMP, N.M. (2010). The Vitreous Gel: More than Meets the Eye. *American Journal of Ophthalmology*, 149, 32-36.

HU, J., HOU, Y., PARK, H., CHOI, B., HOU, S., CHUNG, A. & LEE, M. (2012). Visible light crosslinkable chitosan hydrogels for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 8, 1730–1738.

HUNTER, R.J. (1981). *Zeta Potential in Colloid Science - Principles and Applications*. Academic Press, London.

HUSSAIN, M.R., IMAN, M. & MAJI, T.K. (2013). Determination of degree of deacetylation of chitosan and their effect on the release behavior of essential oil fromchitosan and chitosan–gelatin complex microcapsules. *International Journal of Advanced Engineering Applications*, 1, 4–12.

ISLAM, MD.S., RAHAMAN, MD.S. & YEUM, J.H. (2015). Electrospun novel superabsorbent based on polysaccharide–polyvinyl alcohol–montmorillonite clay nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 115, 69–77.

IWU, M.M. (1993). *Handbook of African Medicinal Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.

JANA, S., MANNA, S., NAYAK, A.K., SEN, K.K. & BASU, S.K. (2014). Carbopol gel containing chitosan-egg albumin nanoparticles for transdermal aceclofenac delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 36–44.

JANG, J., SEOL, Y-J., KIM, H.J., KUNDU, J., KIM, S.W. & CHO, D-W. (2014b). Effects of alginate hydrogel cross-linking density on mechanical and biological behaviors for tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 37, 69–77.

JANG, Y.-J., CHUN, S.Y., KIM, G.N., KIM, J.R., OH, S.H., LEE, J.H., KIM, B.S., SONG, P.H., YOO, E.S. & KWON, T.G. (2014a). Characterization of a novel composite scaffold consisting of acellular bladder submucosa matrix, polycaprolactone and Pluronic F127 as a substance for bladder reconstruction. Acta Biomaterialia, 10, 3117–3125.

JENKINS, A.D., KRATOCHVÌL, P., STEPTO, R.F.T. & SUTER, U.W. (1996). Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996). *Pure and Applied Chemistry*, 68, 2287–2311.

JI, C., KHADEMHOSSEINI, A. & DEHGHANI, F. (2011). Enhancing cell penetration and proliferation in chitosan hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 32, 9719-9729.

JI, L., WANG, W., JIN, D., ZHOU, S. & SONG, X. (2015). In vitro bioactivity and mechanical properties of bioactive glass nanoparticles/polycaprolactone composites. *Materials Science and Engineering C*, 46, 1–9.

KARA, S., TAMERLER, C., BERMEK, H. & PEKCAN, O. (2003). Cation effects on sol–gel and gel–sol phase transitions of κ-carrageenan–water system. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31, 177–185.

KASAPIS, S., AL-MARHOOBI, I.M.A. & KHAN, A.J. (2000). Viscous solutions, networks and the glass transition in high sugar galactomannan and κ-carrageenan mixtures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 13–20.

KATTI, D.R., SHARMA, A., AMBRE, A.H. & KATTI, K.S. (2015). Molecular interactions in biomineralized hydroxyapatite amino acid modified nanoclay: In silico design of bone biomaterials. *Materials Science and Engineering C*, 46, 207–217.

KAZMIRUK, V. (2012). *Scanning Electron Microscopy*. InTech, Croatia.

KELLY, G.S. & N.D. (1996). Bromelain: A Literature Review and Discussion of its Therapeutic Applications. *Alternative Medicine Review*, 1, 243-257.

KIM, B.S. & MOONEY, D.J. (1998). Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 16, 224–230.

KIM, J.K., YOO, C., CHA, Y.-H. & KIM, Y.-H. (2014). Thermo-reversible injectable gel based on enzymatically-chopped low molecular weight methylcellulose for exenatide and FGF 21 delivery to treat types 1 and 2 diabetes. *Journal of Controlled Release*, 194, 316–322.

KIRBY, B.J. (2009). *Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics: Transport in Microfluidic Devices*. Cambridge University Press, New York. Access in: http://www.kirbyresearch.com/textbook.

KONO, H., OTAKA, F. & OZAKI, M. (2014). Preparation and characterization of guar gum hydrogels as carrier materials for controlled protein drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 111, 830–840.

KOOP, H.S., DE FREITAS, R.A., DE SOUZA, M.M., SAVI-JR., R. & SILVEIRA, J.L.M. (2015). Topical curcumin-loaded hydrogels obtained using galactomannan from *Schizolobium parahybae* and xanthan. Carbohydrate Polymers, 116, 229–236.

KUMBAR, S.G., LAURENCIN, C.T. & DENG, M. (2014). *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. 1st ed. Elsevier, Burlington.

KUNERT-KEIL, C., GREDES, T., HEINEMANN, F., DOMINIAK, M., BOTZENHART, U. & GEDRANGE, T. (2015). Socket augmentation using a commercial collagen-based product — an animal study in pigs. *Materials Science and Engineering C*, 46, 177–183.

KURTZ, S.M., KOCAGÖZ, S., ARNHOLT, C., HUET, R., UENO, M. & WALTER, W.L. (2014). Advances in zirconia toughened alumina biomaterials for total joint replacement. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 31, 107–116.

LAI, S.K., WANG, Y.-Y., WIRTZ, D. & HANES, J. (2009). Micro- and macrorheology of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 86–100.

LAKES, R.S. (2007). Biomaterials: an introduction. 3rd ed. Springer, USA.

Latifi, A., Imani, M., Khorasani, M.T. & Joupari, M.D. Plasma surface oxidation of 316L stainless steel for improving adhesion strength of silicone rubber coating to metal substrate. *Applied Surface Science*, 320, 471–481.

LAURIENZO, P. (2010). Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: An overview. *Marine Drugs*, 8, 2435–2465.

LEFNAOUI, S. & MOULAI-MOSTEFA, N. (2014). Investigation and optimization of formulation factors of a hydrogel network based on kappa carrageenan–pregelatinized starch blendusing an experimental design. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 458, 117-125.

LEITÃO, N.C.M.C.S., PRADO, G.H.C., VEGGI, P.C., MEIRELES, M.A.A. & PEREIRA, C.G. (2013). *Anacardium occidentale* L. leaves extraction via SFE:

Global yields, extraction kinetics, mathematical modeling and economic evaluation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 78, 114–123.

LI, C., LI, C., LIU, Z., LI, Q., YAN, X., LIU, Y. & LU, W. (2014). Enhancement in bioavailability of ketorolac tromethamine via intranasal in situ hydrogel based on poloxamer 407 and carrageenan. *International Journal of Pharmaceutics*, 474, 123–133.

LIM, H.-P., TEY, B.-T. & CHAN, E.-S. (2014). Particle designs for the stabilization and controlled-delivery of protein drugs by biopolymers: A case study on insulin. *Journal of Controlled Release*, 186, 11–21.

LIU, J., LI, Q., SU, Y., YUE, Q. & GAO, B. (2014c). Characterization and swelling–deswelling properties of wheat strawcellulose based semi-IPNs hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, 107, 232–240.

LIU, S., DENG, C., YAO, L., ZHONG, H. & ZHANG, H. (2014a). The key role of metal dopants in nitrogen-doped carbon xerogel for oxygen reduction reaction. *Journal of Power Sources*, 269, 225-235.

LIU, Y., YU, S., WU, H., LI, Y., WANG, S., TIAN, Z. & JIANG, Z. (2014b). High permeability hydrogel membranes of chitosan/poly ether-block-amide blends for CO_2 separation. *Journal of Membrane Science*, 469, 198–208.

LÓPEZ-LÓPEZ, E., MORENO, R. & BAUDÍN, C. (2015). Fracture strength and fracture toughness of zirconium titanate–zirconia bulk composite materials. *Journal of the European Ceramic Society*, 35, 277–283.

LU, Q., FANG, J., YANG, J., YAN, G., LIU, S. & WANG, J. (2013). A novel solid composite polymer electrolyte based on poly(ethylene oxide) segmented polysulfone copolymers for rechargeable lithium batteries. *Journal of Membrane Science*, 425–426, 105–112.

LUCAS, E.F., SOARES, B.G. & MONTEIRO, E.E. (2001). *Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica*. E-papers, Rio de Janeiro.

LUO, X. & LI, X. (2014). Design and characterisation of a new duplex surface system based on S-phase hardening and carbon-based coating for ASTM F1537 Co–Cr–Mo alloy. *Applied Surface Science*, 292, 336–344.

LV, Z., CHANG, L., LONG, X., LIU, J., XIANG, Y., LIU, J., LIU, J., DENG, H., DENG, L. & DONG, A. (2014). Thermosensitive in situ hydrogel based on the hybrid of hyaluronic acid and modified PCL/PEG triblock copolymer. *Carbohydrate Polymers*, 108, 26–33.

MACARTAIN, P., JAACQUIER, J.C. & DAWSON, K.A. (2003). Physical characteristics of calcium induced κ-carrageenan networks. *Carbohydrate Polymers*, 53, 395–400.

MACIEL, J.S., PAULA, H.C.B., MIRANDA, M.A.R., SASAKI, J.M. & DE PAULA, R.C.M. (2006). Reacetylated Chitosan/Cashew Gum Gel: Preliminary Study for Potential Utilization as Drug Release Matrix. *Journal of Applied Polymer Science*, 99, 326–334.

MADHUMATHI, K.; SHALUMON, K.T.; DIVYA RANI, V.V.; TAMURA, H.; FURUIKE, T. SELVAMURUGAN, N.; NAIR, S.V. & JAYAKUMAR, R. (2009). Wet chemical synthesis of chitosan hydrogel–hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 12–15.

MANDELBAUM, S.H., DI SANTIS, É.P. & MANDELBAUM, M.H.S.'A. (2003). Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 78, 393-410.

MANGIONE, M.R., GIACOMAZZA, D., BULONE, D., MARTORANA, V. & BIARIO, P.L. (2003). Thermoreversible gelation of κ-carrageenan: Relation between conformational transition and aggregation. *Biophysical Chemistry*, 104, 95–105.

MANNION, R.O., MELIA, C.D., LAUNAY, B., CUVELIER, G., HILL, S.E., HARDING, S.E. & MITCHELL,J. R. (1992). Xanthan/locust bean gum interactions at room temperature. *Carbohydrate Polymers*, 19, 91–97.

MARTINI, M.C. (2005). *Introdución a la dermofarmacia y la cosmetologia*. Editorial Acribia, Zaragoza.

MARTINS, J.T., CERQUEIRA, M.A., BOURBON, A.I., PINHEIRO, A.C., SOUZA, B.W.S. & VICENTE, A.A. (2012). Synergistic effects between κ-carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. *Food Hydrocolloids*, 29, 280-289.

MATI-BAOUCHE, N., ELCHINGER, P.-H., DE BAYNAST, H., PIERRE, G., DELATTRE, C. & MICHAUD, P. (2014). Chitosan as an adhesive. *European Polymer Journal*, 60, 198–212.

MATRICARDI, P., DI MEO, C., COVIELLO, T., HENNINK, W.E. & ALHAIQUE, F. (2013). Interpenetrating Polymer Networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 1172–1187.

MCHUGH, D.J. (2003). *Ch. 7: Carrageenan. In A guide to the seaweed industry: FAO fisheries technical paper 441*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

MIGUEL, S.P., RIBEIRO, M.P., BRANCAL, H., COUTINHO, P. & CORREIA, I.J. (2014). Thermoresponsive chitosan–agarose hydrogel for skin regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 111, 366–373.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2013). Setor público responde por apenas 42% dos gastos com saúde no país. http://memoria.ebc.com.br/agenciabrasil/assunto-galeria/ministerio-da-saude, acessado em 13/08/2014.

MODJARRAD, K. & EBNESAJJAD, S. (2014). *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices*. Elsevier, San Diego.

MONTEIRO, F.M.F.; SILVA, G.M.M.; SILVA, J.B.R.; PORTO, C.S.; CARVALHO JR., L.B.; LIMA-FILHO, J.L. CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. & PORTO, A.L.F. (2007). Immobilization of trypsin on polysaccharide film from Anacardium occidentale L. and its application as cutaneous dressing. *Process Biochemistry*, 42, 884–888.

MORGANTI, P., RUOCCO, E., WOLF, R. & RUOCCO, V. (2001). Percutaneous absorption and delivery systems. *Clinics in Dermatology*, 19, 489-501.

MORRIS, A.H. & KYRIAKIDES, T.R. (2014). Matricellular proteins and biomaterials. *Matrix Biology*, 37, 183–191.

MOSER, K., KRIWET, K., KALIA, Y.N. & GUY, R.H. (2001). Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. *European Journal of Pharmaceutics and Bipharmaceutics*, 82, 103-112.

MOURA, B.H.F., ASSIS, R.H.B., FRANCO, P.I.B.M., ANTONIOSI FILHO, N.R. & RABELO, D. (2013). Synthesis and characterization of composites based on polyaniline and styrene–divinylbenzene copolymer using benzoyl peroxide as oxidant agente. *Reactive & Functional Polymers*, 73, 1255–1261.

MURACHI, T. (1976). *Bromelain enzymes*. In: Lorand, L. Methods in Enzymology, 45, 475-485. Academic Press, New York.

MUZZARELLI, R.A., ILARI, P., TARSI, R., DUBINI, B. & XIA, W. (1994). Chitosan from *Absidiacoerulea*. *Carbohydrate Polymers*, 25, 45–50.

NAYOUF, M. (2003). *Étude rhéologique et structurale de la qualité texturante du système amidon/kappa-carraghénane en relation avec le traitement thermomécanique (Thèse de Doctorat)*. École Nationale des Ingénieurs des Techniques des Industries Agricoles et Alimentaires, Nantes, France.

NESON, D.L. & COX, M.M. (2008). *Lehninger, Principles of Biochemistry*. 5th ed. W.H. Freeman and Company, New York.

NICODEMUS, G.D. & BRYANT, S.J. (2008). Cell encapsulation in biodegradable hydro-gels for tissue engineering applications. *Tissue Engineering B*, 14, 149–165.

NISHINARI, K. & TAKAHASHI, R. (2003). Interaction in polysaccharide solutions and gels. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8, 396-400.

OSADA, Y., KAJIWARA, K., FUSHIMI, T., IRASA, O., HIROKAWA, Y., MATSUNAGA, T., SHIMOMURA, T., WANG, L. & ISHIDA, H. (2001). *Gels Handbook: The* Fundamentals. Vol. 4. Elsevier, Waltham.

PARK, J.B. & LAKES, R.S. (1992). *Biomaterials: an introduction*. 2nd ed. Plenum Press: New York.

PATEL, A.R., SCHATTEMAN, D., DE VOS, W.H., LESAFFER, A. & DEWETTINCK, K. (2013). Preparation and rheological characterization of shellac oleogels and oleogel-based emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 411, 114–121.

PAULA, H.C.B., DE PAULA, R.C.M. & BEZERRA, S.K.F. (2006). Swelling and Release Kinetics of Larvicide-Containing Chitosan/Cashew Gum Beads. *Journal of Applied Polymer Science*, 102, 395–400.

PAULA, H.C.B., SOMBRA, F.M., CAVALCANTE, R.F., ABREU, F.O.M.S. & DE PAULA, R.C.M. (2011). Preparation and characterization of chitosan/cashewgumbeads loaded with *Lippia sidoides* essential oil. *Materials Science and Engineering C*, 31, 173–178.

PEREIRA, D.S.T.; LIMA-RIBEIRO, M.H.M.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; CAVALCANTI, C.C.B.; PONTES-FILHO, N.T.; COELHO, L.C.B.B.; CARNEIRO-LEÃO. A.M.A. & CORREIA, M.T.S. (2012). Topical application effect of the isolectin hydrogel (Cramoll 1,4) on second-degree burns: experimental model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1-11.

PEREIRA, L., SOUSA, A., COELHO, H., AMADO, A.M. & RIBEIRO-CLARO, P.J.A. (2003). Use of FTIR, FT-Raman and ^{13}C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomolecular Engineering*, 20, 223-228.

PINHEIRO, A.C., BOURBON, A.I., ROCHA, C., RIBEIRO, C., MAIA, J.M., GONÇALVES, M.P., TEIXEIRA, J.A. & VICENTE, A.A. (2011). Rheological characterization of κ-carrageenan/galactomannan and xanthan/galactomannan gels: Comparison of galactomannans from non-traditional sources with conventional galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, 83, 392–399.

PITOMBEIRA, N.A.O., NETO, J.G.V., SILVA, D.A., FEITOSA, J.P.A., PAULA, H.C.B. & DE PAULA, R.C.M. (2015). Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. *Carbohydrate Polymers*, 117, 610–615.

POLLARD, M.A., EDER, B., FISCHER, P. & WINDHAB, E.J. (2010). Characterization of galactomannans isolated from legume endosperms of Caesalpinioideae and Faboideae subfamilies by multidetection aqueous SEC. *Carbohydrate Polymers*, 79, 70-84.

PORTO, B.C. & CRISTIANINI, M. (2014). Evaluation of cashew tree gum (*Anacardium occidentale* L.) emulsifying properties. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 1325-1331.

PRAJAPATI, V.D., JANI, G.K., MORADIYA, N.G., RANDERIA, N.P., NAGAR, B.J., NAIKWADI, N.N. & VARIYA, B.C. (2013). Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide. International Journal of Biological Macromolecules, 60, 83– 92.

PRAJAPATI, V.D., MAHERIYA, P.M., JANI, G.K. & SOLANKI, H.K. (2014). Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate Polymers*, 105, 97–112.

RAHM, D.H. & LABOVITZ, J.M. (2007). Perioperative Nutrition and the Use of Nutritional Supplements. *Clinics Podiatric Medicine and Surgery*, 24, 245–259.

RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J. & LEMONS, J.E. (2013). *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 3rd Edition. Elsevier, Waltham.

ROBERTS, G.A.F. (2008). *Thirty years of progress in chitin and chitosan*. Paper presented at the Polish Chitin Society, Kazimierz Dolny, Poland.

ROCHAS, C. (1982). *Etude de la transition sol-gel du kappa-carraghenane. These Docteures Sciences Physiques.* Universite Scientifique et Medicale et Institute National Polytechnique de Grenoble, Grenoble, France.

ROSENBERG, L.; KRIEGER, Y.; SILBERSTEINA, E.; ARNONA, O.; SINELNIKOVB, I.A.; BOGDANOV-BEREZOVSKY, A. & SINGER, A.J. (2012). Selectivity of a bromelain based enzymatic debridement agent: A porcine study. *Burns*, 38, 1035–1040.

SALGUEIRO, A.M.; DANIEL-DA-SILVA, A.L.; FATEIXA, S. & TRINDADE, T. (2013). κ-Carrageenan hydrogel nanocomposites with release behavior mediated by morphological distinct Au nanofillers. *Carbohydrate Polymers*, 91, 100–109.

SANDERS, J.K.M. & HUNTER, B.K. (1994). *Modern NMR spectroscopy. A guide for chemists*. 2nd ed. Oxford University Press, Oxford UK.

SCHÄFER, M. & WERNER, S. (2008). Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 628–638.

SCHIRATO, G.V.; MONTEIRO, F.M.F.; SILVA, F.O.; LIMA-FILHO, J.L.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A. & PORTO, A.L.F. (2006). O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. *Ciência Rural, Santa Maria*, 36, 149-154.

SCHRAMM, G. (2006). *Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos*. Artliber, São Paulo.

SHAPIRO, Y.E. (2011). Structure and dynamics of hydrogels and organogels: An NMR spectroscopy approach. *Progress in Polymer Science*, 36, 1184– 1253.

SMITH, A.M., FLEMING, L., WUDEBWE, U., BOWEN, J. & GROVER, L.M. (2014). Development of a synovial fluid analogue with bio-relevant rheology for wear testing of orthopaedic implants. *Journal of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 32, 177–184.

SMITH, B.C. (2011). *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. 2nd ed. CRC Press, New York.

SMITHA, S., SHAJESH, P., MUKUNDAN, P., NAIR, T.D.R. & WARRIER, K.G.K. (2007). Synthesis of biocompatible hydrophobic silica–gelatin nano-hybrid by sol–gel process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 55, 38–43.

SOARES, P.A.G., BOURBON, A.I., VICENTE, A.A., ANDRADE, C.A.S., BARROS JR., W., CORREIA, M.T.S., PESSOA JR., A. & CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. (2014). Development and characterization of hydrogels based on natural polysaccharides: Policaju and chitosan. *Materials Science and Engineering C*, 42, 219–226.

SOH, E., KOLOSN, E. & RUYS, A.J. (2015). Foamed high porosity alumina for use as a bone tissue scaffold. *Ceramics International*, 41, 1031–1047.

SOLANKI, H.K., SHAH, D.A., MAHERIYA, P.M. & PATEL, C.A. (2015). Evaluation of anti-inflammatory activity of probiotic on carrageenan-induced paw edema in Wistar rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1277–1282.

SOLOMONS, T.W.G. & FRYHLE, C.B. (2011). *Organic Chemistry*. 10th ed. Wiley, England.

SOUZA, M.P., CERQUEIRA, M.A., SOUZA, B.W.S., TEIXEIRA, J.A., PORTO, A.L.F., VICENTE, A.A. & CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. (2010). Polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. tree gum (Policaju) as a coating for Tommy Atkins mangoes. *Chemical Papers*, 64, 475–481.

STANKOVA, L., FRACZEK-SZCZYPTA, A., BLAZEWICZ, M., FILOVA, E., BLAZEWICZ, S., LISA, V. & BACAKOVA, L. (2014). Human osteoblast-like MG 63 cells on polysulfone modified with carbon nanotubes or carbon Nanohorns. *Carbon*, 67, 578–591.

STUART, B. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fudamentals and Applications*. Wiley, England.

SWORN, G. (2000). In G.O. Phillips & P.A. Williams (Eds.), *Xanthan gum in handbook of hydrocolloids* (pp. 103–116). Woodhead Publishing. Ch.6, Cambridge, UK.

TAKEMESA, M. & CHIBA, A. (2001). Gelatin mechanism of κ and ι-Carrageenan investigated by correlation between the strain-optical coefficient and the dynamic shear modulus. *Macromolecules*, 34, 7427–7434.

TAKO, M., QI, Z.-Q., YOZA, E. & TOYAMA, S. (1999). Synergistic interaction between κ-carrageenan isolated from *Hypnea charoides* LAMOUROUX and galactomannan on its gelation. *Food Research International*, 31, 543-548.

TAUSSIG, S.J. & BATKIN, S. (1988). Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. *Journal of Ethnopharmacology*, 22, 191-203.

TOFAIL, S.A.M., BUTLER, J., GANDHI, A.A., CARLSON, J.M., LAVELLE, S., CARR, S., TIERNAN, P., WARREN, G., KENNEDY, K., BIFfi, C.A., BASSANI, P. &

TUISSI, A. (2014). X-ray visibility and metallurgical features of NiTi shape memory alloy with erbium. *Materials Letters*, 137, 450–454.

TONELI, J.T.C.L., MURR, F.E.X. & PARK, K.J. (2005). Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 7, 181-204.

TU, Q., WANG, J.-C., LIU, R., CHEN, Y., ZHANG, Y., WANG, D.-E., YUAN, M.-S., XU, M.-S. & WANG, J. (2013). Click synthesis of neutral, cationic, and zwitterionic poly(propargyl glycolide)-co-poly(ε-caprolactone)-based aliphatic polyesters as antifouling biomaterials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108, 34–43.

U.S. PHARMACOPEIA. (2010). *2010–2011 Food Chemical Codex*. 7th ed. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

ULBRICHT, J., JORDAN, R. & LUXENHOFER, R. (2014). On the biodegradability of polyethylene glycol, polypeptoids and poly(2-oxazoline)s. *Biomaterials*, 35, 4848-4861.

VAN DE VELDE, I.F. & DE RUITER, G.A. (2002). *Chapter 9: Carrageenan*. In S. DeBaets, E.J. Vandamme & A. Steinbuchel (Eds.), Biopolymers, Volume 6, Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes (pp. 245–273). Wiley-VCH: Weinheim, Germany.

VUDJUNG, C., CHAISUWAN, U., PANGAN, U., CHAIPUGDEE, N., BOONYOD, S., SANTAWITEE, O. & SAENGSUWAN, S. (2014). Effect of Natural Rubber Contents on Biodegradation and Water Absorption of Interpenetrating Polymer Network (IPN) Hydrogel from Natural Rubber and Cassava Starch. *Energy Procedia*, 56, 255–263.

WANG, F., LI, Z., KHAN, M., TAMAMA, K., KUPPUSAMY, P., WAGNER, W.R., SEN, C.K. & GUAN, J. (2010). Injectable, rapid gelling and highly flexible hydrogel composites as growth factor and cell carriers. *Acta Biomaterialia*, 6, 1978–1991.

WANG, X., LIU, S., ZHAO, Q., LI, N., ZHANG, H., ZHANG, X., LEI, X., ZHAO, H., DENG, Z., QIAO, J., CAO, Y., NING, L., LIU, S. & DUAN, E. (2014). Three-dimensional hydrogel scaffolds facilitate in vitro self-renewal of human skin-derived precursors. *Acta Biomaterialia*, 10, 3177–3187.

WOLF, M.T., DEARTH, C.L., RANALLO, C.A., LOPRESTI, S.T., CAREY, L.E., DALY, K.A., BROWN, B.N. & BADYLAK, S.F. (2014). Macrophage polarization in response to ECM coated polypropylene mesh. *Biomaterials*, 35, 6838-6849.

WONG, J.Y. & BRONZINO, J.D. (2007). *Biomaterials*. CRC Press, New York.

WU, S-Y; HU, W.; ZHANG, B.; LIU, S.; WANG, J-M & WANG, A-M. (2012). Bromelain Ameliorates the Wound Microenvironment and Improves the Healing of Firearm Wounds. *Journal of Surgical Research*, 176, 503–509.

XU, R., LUO, G., XIA, H., HE, W., ZHAO, J., LIU, B., TAN, J., ZHOU, J., LIU, D., WANG, Y., YAO, Z., ZHAN, R., YANG, S. & WU, J. (2015). Novel bilayer wound dressing composed of silicone rubber with particular micropores enhanced wound re-epithelialization and contraction. *Biomaterials*, 40, 1-11.

YANG, D., LÜ, X., HONG, Y., XI, T. & ZHANG, D. (2014a). The molecular mechanism for effects of TiN coating on NiTi alloy on endothelial cell function. *Biomaterials*, 35, 6195-6205.

YANG, L., YANG, Y., CHEN, Z., GUO, C. & LI, S. (2014b). Influence of super absorbent polymer on soil water retention, seed germination and plant survivals for rocky slopes eco-engineering. *Ecological Engineering*, 62, 27–32.

Yavari, S.A., Ahmadi, S.M., van der Stok, J. Wauthle, R., Riemslag, A.C., Janssen, M., SCHROOTEN, J., WEINANS, H. & ZADPOOR, A.A. (2014). Effects of bio-functionalizing surface treatments on the mechanical behavior of open porous titanium biomaterials. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 36, 109–119.

YILDIRIMER, L., THANH, N.T.K. & SEIFALIAN, A.M. (2012). Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. *Trends in Biotechnology*, 30, 638-648.

YU, L., & DING, J. (2008). Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chemical Society Reviews*, 37, 1473–1481.

YU, S., HU, J., PAN, X., YAO, P. & JIANG, M. (2006). Stable and pH-Sensitive Nanogels Prepared by Self-Assembly of Chitosan and Ovalbumin. *Langmuir*, *22,* 2754-2759.

YUGUCHI, Y., URAKAWA, H. & KAJIWARA, K. (2003). Structural characteristics of carrageenan gels: Various types of counter ions. *Food Hydrocolloids*, 17, 481–485.

ZETASIZER NANO SERIES - USER MANUAL. (2004). *Mano*, 317, 1. Malvern Instruments Ltd., England.

ZHANG, Y.; NIUA, Y.; LUO, Y.; GEC, M.; YANG, T.; YU, L. & WANG, Q. (2014). Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate–chitosan hydrochloride double layers. *Food Chemistry*, 142, 269–275.

ANEXO A - ARTIGOS GERADOS DURANTE O DOUTORADO

PAULO A.G. SOARES, ISMAEL N.L. QUEIROZ & VITOR H. POMIN. (2017). NMR structural biology of sulfated glycans. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35: 1069–1084, DOI: http://10.1080/07391102.2016.1171165.

PRISCILLA B.S. ALBUQUERQUE, CAROLINE S. SILVA, **PAULO A.G. SOARES**, WILSON BARROS JR., MARIA T.S. CORREIA, LUANA C.B.B. COELHO, JOSÉ A. TEIXEIRA, MARIA G. CARNEIRO-DA-CUNHA. (2016). Investigating a galactomannan gel obtained from Cassia grandis seedsas immobilizing matrix for Cramoll lectin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86: 454–461. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.107.

PAULO A.G. SOARES, ISMAEL N.L. QUEIROZ, GUSTAVO R.C. SANTOS, PAULO A.S. MOURÃO, VITOR H. POMIN. (2016). NMR-based conformation and dynamics of a tetrasacchariderepeating sulfated fucan substituted by different counterions. *Biopolymers*, 105: 840–851. DOI: http://10.1002/bip.22922.

ADELMO C. ARAGÃO-NETO, **PAULO A.G. SOARES**, MARIA H.M. LIMA-RIBEIRO, ELAINE J.A. CARVALHO, MARIA T.S. CORREIA, MARIA G. CARNEIRO-DA-CUNHA. (2017). Combined therapy using low level laser and chitosan-policaju hydrogel for wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95: 268–272. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.019.

PRISCILLA B.S. ALBUQUERQUE, **PAULO A.G. SOARES**, ADELMO C. ARAGÃO-NETO, GIWELLINGTON S. ALBUQUERQUE, LUÍS C.N. SILVA, MARIA H.M. LIMA-RIBEIRO, JACINTO C. SILVA NETO, LUANA C.B.B. COELHO, MARIA T.S. CORREIA, JOSÉ A.C. TEIXEIRA, MARIA G. CARNEIRO-DA-CUNHA. (2017). Healing activity evaluation of the galactomannan film obtained fromCassia grandis seeds with immobilized Cratylia mollis seed lectin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102: 749–757. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.064.