

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**



ANA CAROLINE MARTINS VIEIRA

**APLICAÇÃO DE BIOGÉIS NATURAIS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE
BIOMASSA DO CERRADO**

Brasília/DF

2019

ANA CAROLINE MARTINS VIEIRA

**APLICAÇÃO DE BIOGÉIS NATURAIS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE
BIOMASSA DO CERRADO**

Tese apresentada à Universidade de Brasília
como parte das exigências do programa de Pós-
Graduação em Tecnologias Química e
Biológica para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof.^a Dr.^a Sarah Silva Brum

Co-orientador

Prof. Dr. Fabrício Machado Silva

Brasília/DF

2019

Folha de Aprovação

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese do (a) aluno (a) **Ana Caroline Martins Vieira**, matrícula nº **15/00113960**, intitulada **“Aplicação de Biogéis Naturais Desenvolvidos a Partir de Biomassa do Cerrado”**, apresentada no (a) Sala de Conferência do CDT da Universidade de Brasília (UnB) em 16 de agosto de 2019.

Prof.^a Dra. Sarah Silva Brum
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof. Dr. Sérgio Botelho de Oliveira
Membro Titular (IFG)

Prof.^a Dra. Andressa Regina Vasques Mendonça
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio
Membro Titular (FM/UnB)

Prof. Dr. Fábio Moreira da Silva
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 16 de agosto de 2019.

A Deus e aos meus pais:
Carlos Eduardo e Maria Helena
Amo vocês

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde, por me proteger e guardar todos os dias, por preparar o meu caminho colocando pessoas tão especiais na minha vida e por me impor obstáculos também, me mostrando logo em seguida que eu podia superá-los. Tudo foram dádivas que me tornaram o que sou. Sem Ele nada seria possível;

Aos meus pais, Carlos Eduardo e Maria Helena, minha tia-madrinha Tereza e meu irmão Daniel, que me conduziram pelos caminhos certos da vida e me amam incondicionalmente. Obrigada por entender minhas ausências, pelas palavras de carinho e conforto, pelas orações, pelo abraço apertado nas chegadas e partidas, pelo orgulho estampado em suas faces. É por vocês e para vocês que tento todos os dias ser um Ser Humano melhor. Amo muito vocês!

A vó Ieda e tia Geysa pelas orações diárias, e todos os familiares que me acompanharam e me apoiaram nessa difícil tarefa.

A Amélia, Neto e vó Dionísia que foram a campo comigo nos dias quentes e secos de agosto em busca deste até então desconhecido fruto. Obrigada por me ensinar a “catar cavaco” e por me contarem suas histórias com Tingui. Ainda a Agmar e Graci pelas divertidas coletas e o merecido refresco no Itiquira, além de Viviana, Ana Paula, Mary, Paulinha, Danila, Eliane e Karon. A alegria, o cuidado, entusiasmo e disposição de vocês foram de extrema importância para que eu tivesse força e motivação extra para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho Saulo, Emerson, Fernanda e Gabi pelos muitos anos de amizade, por terem segurado a barra durante as minhas ausências, pelo incentivo e apoio constantes. Que não lhes falem saúde, esperança, alegria e muita paz em suas vidas.

A Elza e Quênia, pelas muitas horas de acupuntura, massagem, terapia e conversas. A ajuda e o amor a profissão de vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui com saúde. Muito obrigada! Que a jornada de vocês seja iluminada.

A minha querida orientadora Sarah Brum por toda paciência e dedicação, pelos ensinamentos, pelas longas conversas, por acreditar em mim e fazer com que este trabalho

crecesse e se destacasse. Muito obrigada por ser minha orientadora viu! na academia e na vida. Você é uma pessoa de luz e muito querida, e eu tenho o maior orgulho e alegria em trabalhar com você.

Ao prof. Fabrício Machado pelas orientações, aulas, livros, pela técnica, conselhos diversos e principalmente por disponibilizar todos os recursos necessários para a realização desta pesquisa, inclusive seu tempo. Professor, sua experiência e cooperação são fundamentais neste projeto. Muitíssimo obrigada!

Ao Instituto Federal de Brasília pelo incentivo a capacitação, o qual foi imprescindível na conclusão deste trabalho além dos Laboratórios de Materiais e Combustíveis (LMC), Catálise (LabCat), Desenvolvimento de Processos Químicos (LDPQ), Laboratório (LIMA) Laboratório Multiusuário do Instituto de Química Laboratório de Microscopia do Instituto de Biologia, Laboratório de Dermatologicologia da Faculdade medicina e Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC) da Faculdade de Saúde, todos estes citados pertencentes a Universidade de Brasília, Embrapa Agroenergia, Laboratórios de Meio Ambiente e Construção Civil do Instituto Federal de Brasília e aos colegas de bancada que me acolheram com muito carinho, além de me auxiliarem a desenvolver habilidades que farão parte de minha vivência profissional.

Aos meus companheiros de bancada que estiveram sempre comigo me ajudando, me apoiando e me divertindo. Arthur, Isabella, Valéria e Vitor vocês são químicos, colegas de trabalho e profissionais incríveis!

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste Doutorado. Gratidão!

RESUMO

Os hidrogéis formulados a partir de polissacarídeos tem ganhado grande importância nos mais variados campos de aplicação, sendo utilizados desde produtos de higiene pessoal até dispositivos de liberação controlada de fármacos e reparação de tecidos no corpo humano. Classificados como biocompatíveis, os hidrogéis obtidos de fontes naturais são capazes de absorver grandes quantidades de água e fluidos biológicos, sendo, portanto, esta sua principal aplicação em artigos médicos e farmacêuticos. No entanto, necessitam de etapas criteriosas de eliminação de componentes tóxicos, seja na obtenção da matéria-prima ou do produto final. Este trabalho visa otimizar a purificação de um hidrogel natural obtido a partir da *Magonia pubescens* – fruto típico do Cerrado Brasileiro - através de dois métodos distintos: separação do hidrogel da biomassa por via seca e úmida; seguida de purificação oxidativa e modificação química com N'-N-metilenobisacrilamida (MBA), de forma que o produto apresentasse capacidade de absorver água mais de 150 vezes sua própria massa. Os Biogéis Purificados e Modificados por Via Seca (BMES) e Úmida (BMEU) foram avaliados por FT-IR, TG/DTG/DSC, MEV e grau de intumescimento. O estudo do método de purificação empregado se mostrou mais adequado às aplicações sugeridas quando utilizado solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em pH 10, uma vez que produzem menos resíduos e subprodutos tóxicos ou não desejáveis, além de não alterar as características de absorção de água do biogel, transformando-o em um produto homogêneo e translúcido. As análises de FT-IR revelaram a incorporação de MBA na matriz polimérica mostrou o surgimento de bandas características do grupamento amida e TG/DTG/DSC resultaram em termogramas típicos de materiais celulósicos. As análises texturais mostraram ainda a aparência fibrosa e porosa do material, além do surgimento de novas estruturas atribuídas a autopolimerização do agente reticulante. Entretanto, quanto a capacidade de absorção de água, a modificação química ainda não se mostrou adequada para BMEU, causando uma grande perda na absorvência do produto. Na pesquisa de viabilidade de uso destes materiais na promoção da saúde humana, o Biogel não modificado foi avaliado quanto a sua toxicidade e como dispositivo de liberação de fármacos, sendo classificado como não tóxico segundo padrões estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Quanto a liberação de fármacos, permitiu que 90% do Diclofenaco sódico e 70% de Anfotericina-B fossem liberados da sua estrutura ficando disponíveis para absorção

cutânea, sendo, portanto, um substituto em potencial para aplicação como veículo para incorporação de fármacos de uso tópico. Simulações de digestibilidade foram ainda aplicadas aos materiais, demonstrando que os mesmos podem ser estudados como dispositivos auxiliares de controle e redução de peso pois, em solução estomacal, apresentam intumescimento e pouca dissolução, promovendo saciedade ao paciente por um período longo de tempo. Quando pensado para uso em base cosmética ou farmacológica, os biogéis foram submetidos a testes de prateleira, sugeridos pela ANVISA, a fim de determinar sua durabilidade média sem que apresentasse perda de suas características físico-químicas inicial. Para isso, foram avaliadas características organolépticas como cor, aspecto e odor além de pH e densidade em ambientes controlados. Nos testes, ambos os géis (BEU e BES) apresentaram durabilidade inferior a 90 dias, apresentando contaminação biológica atestada pelo surgimento de fungos e alteração de odor. Pensando na apresentação deste produto, foram testados a formação de filmes com o biogel purificado e obtido por via úmida (BEU) e, após adaptações com glicerol como agente plastificante, o resultado foi um filme de alta qualidade, despertando interesse em sua otimização para diversas aplicações.

Palavras-chave: Biogel, Tingui, Dispositivo de liberação de fármaco, base cosmética.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplo de hidrogéis de nanocelulose comercialmente disponíveis.
Fonte:(BOWIL, 2018; JENACELL, 2018)22
- Figura 2.** Coleta dos frutos nos pontos de amostragem: Distrito de Bezerra (A), Parque Nacional do Itiquira (B), zona rural de Paracatu, MG (C).25
- Figura 3.** Processo de extração do hidrogel natural de *Magonia Pubescens* do envoltório da semente por via úmida (BEU): Intumescimento (A), raspagem (B) e gel *in natura* (C).26
- Figura 4.** Fluxograma de preparação dos biogéis de *Magonia pubescens*28
- Figura 5.** Testes de purificações dos biogéis em pH e concentrações diferentes.....36
- Figura 6.** Diagrama de Pareto de BEU intumescido a temperatura ambiente mostrando a significância da concentração dos reagentes e variação de pH no desempenho (A) e rendimento (B) do produto final37
- Figura 7.** Diagrama de Pareto de BES intumescidos a temperatura ambiente mostrando a significância da concentração dos reagentes e variação de pH no desempenho (A) e rendimento (B) do produto final37
- Figura 8.** Análise gráfica comparativa entre os métodos de purificação e os biogéis extraídos por via seca e úmida38
- Figura 9.** Comparações entre as operações de secagem dos biogéis: A)- secagem em estufa a 60°C e B)- secagem em liofilizador.39
- Figura 10.** Espectroscopia na região do infravermelho do BES e BEU *in natura* (A) e após tratamento oxidativo com peróxido de hidrogênio (B) identificando as bandas dos materiais celulósicos e a eliminação das bandas de lignina, principal componente removido após a purificação41
- Figura 11.** Termograma dos biogéis *in natura*: em A o biogel extraído por via úmida (BEU) e B extraído por via seca (BES). Em C pode ser observado a diferença entre os dois termogramas, evidenciando a maior estabilidade térmica de BES.....43

Figura 12. Termograma dos biogéis purificados: em A o biogel extraído por via úmida (BEU) e B extraído por via seca (BES). Em C pode ser observado a diferença de decomposição entre os dois termogramas	44
Figura 13. Hidrolise ácida dos materiais. Em A é representado as reações com 5, 10 e 1% de ácido sulfúrico, de cor escura, indicando degradação do material. Em B, os frascos com 0,5 e 1% de ácido sulfúrico, onde a cor amarelada representa uma solubilização dos açúcares.	45
Figura 14. Micrografia Eletrônica de Varredura de BEU (A) e BES (B) <i>in natura</i> demonstrando a característica fibrosa do material lignocelulosico.	49
Figura 15. Micrografia Eletrônica de Varredura de BEU (A) e BES (B) evidenciando a formação de poros e cavidades após a purificação e secagem a baixas temperaturas e pressão.	Erro! Indicador não definido.
Figura 15. Micrografia Eletrônica de Varredura de BEU (A) e BES (B) evidenciando a formação de poros e cavidades após a purificação e secagem a baixas temperaturas e pressão.	50
Figura 16. Espectroscopia da região do infravermelho dos Biogéis modificados (A), purificados e modificados por via úmida (B) e purificados e modificados por via seca (C) evidenciando a modificação química com MBAAM	59
Figura 17. Curvas de TG e DTG do biogel purificado e reticulado: em A e B, curvas típicas de materiais celulósicos e em C, D e E demonstrando as diferenças de estabilidade térmica causadas pela reticulação química.....	61
Figura 18. Curvas de DSC para os Biogéis purificados por via seca e úmida e suas respectivas modificações químicas	63
Figura 19. Análise de raios-X dos biogéis extraídos por via seca <i>in natura</i> (A e D), após purificação oxidativa (B e E) e modificados quimicamente (C e F) evidenciando a cristalinidade da celulose após a purificação e a quebra da cristalinidade após a modificação com MBAAM..	65
Figura 20. Micrografia Eletrônica do Biogel Modificado Extraído por via Úmida - BMEU - destacando a incidência de microesferas de polímero e microfibrilas de celulose.....	69

Figura 21. Micrografia Eletrônica do BMES liofilizado destacando a ocorrência de formação de estruturas poliméricas após a modificação química com Metileno-Bis-acrilamida.	69
Figura 22. Viscosidade dos biogéis em diferentes temperaturas: em A Biogel extraído por via úmida e B Biogel extraído por via seca, ambos em intumescimento máximo. Em (C) Biogéis modificados e em associação de Diclofenaco Sódico (D) demonstrando o aumento da viscosidade da formulação.....	71
Figura 23. Comportamento pseudoplástico tixotrópico dos Biogéis.....	73
Figura 24. Gráfico comparativo entre a liberação controlada e administração convencional de fármacos	76
Figura 25. Perfis de liberação controlada de fármacos: I-Taxa de liberação que cai exponencialmente com o tempo; II- taxa de liberação constante, cinética de ordem zero; III- liberação de ordem zero com um atraso; IV- picos de liberação com atraso; V- liberação múltipla com atraso constante.	77
Figura 26. Representação de sistemas de liberação de medicamentos do tipo Monolítico (esquerda) e Reservatório (direita).	78
Figura 27. Sistema de entrega de medicamento por Hidrogéis Termoresponsivo: o Hidrogel é submetido a intumescimento em solução do fármaco e, ao ser submetido à temperatura superior a sua LCST, sofre retração das cadeias liberando o fármaco.	80
Figura 28. Mecanismo de ação dos curativos de hidrogéis: além de absorver os exsudados, o gel promove um ambiente úmido que facilita o processo de cicatrização da pele através da hidratação	81
Figura 29. Ensaio de toxicidade utilizando Artemia Salina: em a) eclosão dos ovos sob iluminação artificial e b) execução do ensaio em placa de 24 poços utilizando os náuplios de Artemia.	89
Figura 30. Determinação do ponto de carga zero do Biogel purificado por via úmida utilizado na formulação para liberação controlada.....	92

Figura 31. Teste de absorção de óleo: (A) solução gástrica; (B) biogel não acetilado em fase aquosa indicando sua hidrofiliicidade (C) biogel acetilado em fase oleosa indicando sua hidrofobicidade e intumescido em óleo após a realização do teste (D). Fonte: o autor	95
Figura 32. Comprimidos de Biogel antes (A) e após (B) teste de simulação de digestão demonstrando sua alta taxa de absorção de fluidos gástricos e baixa solubilidade no meio....	96
Figura 33. Micrografia Eletrônica do BMES com incorporação de Diclofenaco sódico.....	101
Figura 34. Formulações utilizando BEU e BMES como veículo: (A)- Anfotericina-B 1 mg + BEU e (B)- Diclofenaco Sódico 10mg + BMES.....	102
Figura 35. Perfil da liberação de AmB utilizando biogel como veículo: concentração máxima no meio de 67 a 70% da Anfotericina incorporada a matriz do biogel.	104
Figura 36. Liberação de DS em diferentes pHs ressaltando o comportamento de equilíbrio na concentração de fármaco no meio receptor	105
Figura 37. Filme de Biogel purificado extraído por via úmida moldados via <i>casting</i> . Em A, sem plastificante e B com glicerina. Gramatura de 0,0167 g/cm ²	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis e fatores do planejamento 2 ²	27
Tabela 2. Matriz dos experimentos e aleatorização dos ensaios de purificação dos Hidrogéis	27
Tabela 3. Condições reacionais da hidrólise ácida para cada determinação de glicose nos biogéis	33
Tabela 4. Quantificação dos teores de cloro total nos biogéis purificados com clorito	35
Tabela 5. Coeficientes de contrastes, resultados de absorção de água dos BEU obtidos no fatorial 2 ² e Resultado dos testes da capacidade de absorção de água (Q):	36
Tabela 6. Coeficientes de contrastes, resultados de absorção de água dos BES obtidos no fatorial 2 ² e Resultado do Teste Q:	36
Tabela 7. Média de absorção de água pelos biogéis em secagem a baixa pressão e temperatura (liofilizado) e estufa 60°C	39
Tabela 8. Teores de hemicelulose e celulose dos biogéis purificados com diferentes oxidantes	40
Tabela 9. Análise Elementar dos Hidrogéis	42
Tabela 10. quantificação de açúcares das amostras de Biogel obtido por via seca e úmida e suas respectivas purificações	48
Tabela 11. Quantificação dos teores de glicose dos biogéis.....	46
Tabela 12. Índices de Cristalinidade dos biogéis extraídos por via seca in natura, após purificação oxidativa e modificados quimicamente	64
Tabela 13. Quantitativo de metais presentes nos hidrogéis BEU, BES, BMEU e BMES	66
Tabela 14. Grau de Intumescimento do Hidrogéis modificados quimicamente com MBAAm..	67

Tabela 15. Teste de Intumescimento dos biogéis em diferentes condições de pH do estomago humano	93
Tabela 16. Intumescimento em solução de digestão e temperatura corporal	96
Tabela 17. Estudo de estabilidade dos comprimidos de biogel obtido por via umida após purificação	99
Tabela 18. Estudo de estabilidade dos comprimidos de biogel obtido por via seca após purificação	99
Tabela 19. Percentual de Artemia mortas em diferentes concentrações da amostra depois de 8 e 24h de exposição.....	100
Tabela 20. Dose Letal Mediana (DL ₅₀) dos biogéis BEU, BES e BMES testados com Artemia salina	101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Nomenclatura dos biogéis após a purificação oxidativa	28
Quadro 2: Especificações organolépticas dos biogéis	88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	- Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTCP	- Associação Brasileira Técnica de Celulose e Papel
AAm	- Acrilamida
AmB	- Anfotericina-B
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AINE	- Anti-inflamatórios não-esteróides
cP	- centi Pascal
DDDs	- Drug Delivery Devices
DMRI	- Degeneração macular relacionada à idade
DS	- Diclofenaco Sódico
BES	- Biogel Purificado por via seca
BMES	- Biogel Purificado Modificado por Via Seca
BEU	- Biogel Purificado por Via Úmida
BMEU	- Biogel Purificado Modificado por Via Úmida
DPD	- N,N-dietil-p-fenileno diamina
EU	- União Européia
FAO	- Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
HPLC	- <i>High Performance Liquid Chromatograph</i>
IAL	- Instituto Adolfo Lutz
ICH	- <i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
NBr	- Norma Brasileira
LCST	- Lower Critical Solution Temperature
m/m	- Razão entre massa e massa
m/v	- Razão entre massa e volume
MBAAm	- N'-N-metilenobisacrilamida
OMS	- Organização Mundial da Saúde
TEMED	- N,N,N',N' – tetrametil-etilenodiamina
Tg	- Temperatura de transição vítrea

PSA - Polímeros Superabsorventes
PAAm - Poliacrilamida
PCZ - Ponto de carga Zero
UCST -Upper Critical Solution Temperature

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO HIDROGEL NATURAL DO ENVOLTÓRIO DE *MAGONIA PUBESCENS ST.HIL19*

1	Introdução	19
1.1.	Hidrogéis de Fontes Naturais.....	21
1.2.	Métodos de Extração de Celulose.....	23
2	Materiais e Métodos	24
2.1.	Coleta e Amostragem dos frutos de <i>Magonia Pubescens</i>	24
2.2.	Métodos de Extração do Hidrogel Natural do Envoltório de <i>Magonia Pubescens</i>	25
2.3.	Métodos de Purificação do Hidrogel <i>in natura</i>	26
2.3.1.	Tratamento com Clorito de Sódio 30%	26
2.3.2.	Tratamento com Peróxido de Hidrogênio	27
2.4.	Secagem dos Biogéis	28
2.5.	Análise do Teor Residual de Cloro Total	29
2.6.	Caracterização Físico-Química dos Biogéis	29
2.6.1.	Holocelulose	29
2.6.2.	Celulose	29
2.6.3.	Hemicelulose	30

2.6.4.	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho - FTIR	30
2.6.5.	Análises Térmicas.....	30
2.6.5.1.	Análise Termogravimétrica (TG) e Análise Termogravimétrica Diferencial (DTG)	30
2.6.6.	Análise Elementar – CHN	30
2.6.7.	Grau de Intumescimento (Q)	31
2.6.8.	Análises Texturais - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
2.7.	Caracterização Bioquímica dos biogéis purificados por via seca e úmida	31
2.7.1.	Carboidratos Estruturais	32
2.7.1.1.	Pectinas.....	32
2.7.1.2.	Açúcares por Cromatografia Líquida - HPLC	32
2.7.2.	Quantificação de Glicose.....	33
3	Resultados e Discussão	34
3.1.	Caracterização físico-química dos biogéis purificados por via seca e úmida....	40
3.1.1.	Teor de celulose e hemicelulose.....	40
3.1.2.	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho- FTIR.....	40
3.1.3.	Análise Elementar – CHNO	41
3.1.4.	Análises Térmicas - Análise Termogravimétrica (TG) e Análise Termogravimétrica diferencial (DTG).....	42
3.2.	Caracterização Bioquímica dos biogéis purificados por via seca e úmida	45
3.2.1.	Carboidratos Estruturais	45

3.2.1.1. Pectinas.....	45
3.2.2. Quantificação dos Teores de Glicose por teste enzimático	45
3.2.2.1. Açúcares por Cromatografia Líquida - HPLC	47
3.2.3. Análises Texturais – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	48
4 Conclusões	50

CAPÍTULO 2

MODIFICAÇÃO QUÍMICA DOS HIDROGÉIS PURIFICADOS

1 Introdução	52
1.1. Classificação dos Hidrogéis.....	52
1.2. Reticulação Química.....	54
2 Material e Métodos	55
2.1. Modificação dos Hidrogéis Purificados com N'-N-metilenobisacrilamida	55
2.2. Caracterização dos Biogéis Modificados.....	56
2.2.1. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho- FTIR	56
2.2.2. Análises Térmicas.....	56
2.2.2.1. Análise Termogravimétrica (TG) e Análise Termogravimétrica Diferencial (DTG).....	56
2.2.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	56
2.2.3. Raios-X e Cristalinidade	57
2.2.4. Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X - EDX	57
2.2.5. Grau de Intumescimento	57

2.2.6.	Análises Texturais - Microscopia Eletrônica de Varredura	58
2.2.7.	Caracterização Mecânica - Viscosidade	58
3	Resultados e Discussão	58
3.1.	Verificação da Incorporação do Agente Reticulante	58
3.1.1.	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho- FTIR	58
3.2.	Análises Térmicas.....	60
3.2.1.	Análise Termogravimétrica (TG) e análise Termogravimétrica Diferencial (DTG)	60
3.2.2.	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	62
3.3.	Caracterização dos Biogéis Modificados	64
3.3.1.	Raios-X e Cristalinidade.....	64
3.3.2.	Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X- EDX	65
3.3.3.	Grau de Intumescimento (Q)	66
3.3.4.	Análises Texturais- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	68
3.3.5.	Caracterização Mecânica - Medidas de Viscosidade	69
4	Conclusões	74

CAPÍTULO 3

APLICAÇÃO DOS HIDROGÉIS COMO VEÍCULO DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

1	Introdução	75
1.1.	Mecanismo de liberação controlada.....	76
1.2.	Formas de Aplicação dos hidrogéis nos sistemas de liberação controlada.....	80

1.2.1.	Uso tópico	80
1.2.2.	Uso ocular	81
1.2.3.	Comprimidos Vaginais	82
1.2.4.	Subcutâneo	82
1.2.5.	Uso oral	83
1.2.6.	Cápsulas de controle da obesidade	83
2	Material e Métodos	84
2.1.	Simulação de absorção de fluidos biológicos - suco gástrico	84
2.2.	Modificação da estrutura – adsorventes de óleo.....	84
2.3.	Esterificação dos materiais	84
2.4.	Capacidade de Adsorção de óleo em suco gástrico (AO)	85
2.5.	Simulação da Digestão	86
2.6.	Teste de estabilidade acelerada.....	86
2.7.	Ensaio analítico organoléptico e físico-químico	87
2.8.	Teste de Biotoxicidade- Artemia Salina.....	88
2.9.	Determinação do Ponto de carga Zero (PCZ)	89
2.10.	Análises Texturais - Microscopia Eletrônica de Varredura.....	90
2.11.	Simulação de Liberação em Uso Tópico - Modelo de Dissolução Sem Membranas	90
2.11.1.	Incorporação de Diclofenaco e Anfotericina-B ao Biogel	90
2.11.2.	Liberação de Diclofenaco Sódico.....	90

2.11.3.	Liberação de Anfotericina-B modificada	91
2.12.	Formação de filmes de Biogel	91
3	Resultados e Discussão	92
3.1.	Determinação do Ponto de Carga Zero (PCZ)	92
3.2.	Simulação de absorção de fluidos biológicos- suco gástrico	93
3.3.	Esterificação para absorção de óleo	94
3.4.	Simulação da Digestão	96
3.5.	Teste de estabilidade acelerada e Ensaio analítico organoléptico e físico-químico	97
3.6.	Teste de Biotoxicidade- Artemia Salina	100
3.7.	Análises Texturais - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	101
3.8.	Simulação de liberação em uso tópico	102
3.9.	Liberação de Anfotericina-B	102
3.10.	Liberação Diclofenaco Sódico	104
3.11.	Formação de filmes de Biogel	106
4	Conclusão	108
	REFERÊNCIAS	110

INTRODUÇÃO

O Cerrado é um importante bioma brasileiro, sendo, em área, o segundo maior da América do Sul e, em diversidade biológica, é a savana mais rica do mundo, abrigando mais de 10 mil espécies de plantas nativas (Brasil - Ministério do Meio Ambiente, [s.d.]). Estima-se ainda que este bioma possa perder até 34% de sua área atual até o ano de 2050, resultando em um déficit de aproximadamente 1140 espécies, número oito vezes maior que o número oficial de plantas extintas em todo o mundo desde o ano de 1500 (STRASSBURG et al., 2017)

Estima-se ainda que, de todas as espécies frutíferas catalogadas do Cerrado, apenas 40 são comercialmente exploradas, sendo, portanto, o bioma um atrativo não só para as comunidades locais que sobrevivem do extrativismo como para toda comunidade acadêmica e industrial, que ainda explora pouco ou quase nada os recursos naturais disponíveis nesta Savana brasileira.

Neste contexto, tendo em vista a urgente necessidade de preservação deste bioma tão rico e importante, algumas espécies se destacam pelas suas características peculiares, desenvolvidas justamente para garantir sua sobrevivência nas condições climáticas do Cerrado. Entre essas espécies, está o Tingui. Na literatura, o fruto do Tingui foi estudado como matéria-prima para o desenvolvimento de condicionadores de solo, sendo capaz de elevar a quantidade de água total disponível em 71% e diminuir a lixiviação de nutrientes do solo (VILELA, 2017). Em outra pesquisa, foi ainda desenvolvido um biogel superabsorvente a partir da modificação química do hidrogel natural presente no envoltório da semente, o qual foi capaz de absorver água 80 vezes seu próprio peso, sendo um substituto em potencial para hidrogéis sintéticos (VIEIRA, 2015). Em suma, esta espécie ainda pouco explorada apresenta grande potencial de aplicação em vários produtos, necessitando cada vez mais de pesquisas e projetos.

Os hidrogéis, também chamados de hidroretentores, são polímeros que tem a capacidade de absorver em suas estruturas grande quantidade de água e/ou fluidos biológicos sem sofrer dissolução de suas cadeias. Devido a estas características, são utilizados nos mais variados ramos da indústria, desde utilidades domésticas como fraldas, absorventes descartáveis até produtos de uso médico e farmacêutico como substituição de cartilagens e cápsulas de liberação controlada de medicamentos. (CHANG; ZHANG, 2011; KONO; FUJITA, 2012; LIU et al., 2014). Estes materiais estão ainda sendo comercializados como dispositivos para controle e redução de peso e tratamento de obesidade, sendo aplicados como

cápsulas de hidrogéis, conhecidas comercialmente como Gelesis 100. Essa capacidade de absorver líquidos pode, no organismo, gerar sensação de saciedade, auxiliando na manutenção da dieta.

O método de obtenção dos hidrogéis é descrito na literatura por diversas rotas e a partir de matérias-primas sintéticas ou naturais. Entre as vantagens da síntese de hidrogéis de fontes naturais, como os de celulose, hemicelulose e seus derivados estão sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade e abundância na natureza, contudo, os trabalhos relacionados relatam a síntese desse material a partir de polissacarídeos de difícil obtenção e/ou alto grau de pureza, tais como celulose microcristalina e seus derivados, ácido hialurônico, alginatos, entre outros (CHANG; ZHANG, 2011).

Os hidrogéis, porém, podem ainda ser obtidos a partir outras fontes de matéria-prima, tanto pela modificação química de biomassa quanto pela utilização de polímeros naturais como o obtido a partir do Tingui. Contudo, para evitar contaminação, desenvolvimento de reações alérgicas, entre outras alterações não desejadas devido a presença de compostos orgânicos e/ou inorgânicos naturalmente presentes na biomassa, é preciso purificá-lo. A partir disso, modificá-lo quimicamente e otimizar os processos de produção traz ainda mais vantagens, melhorando sua performance para torná-los competitivos no mercado. Neste contexto, a reticulação representa um meio de se obter hidrogéis com propriedades diferenciadas, ultrapassando estas barreiras e criando novos materiais com características físicas, químicas e biológicas capazes de atender ao mercado de maneira sustentável.

Neste trabalho, portanto, um hidrogel natural foi produzido a partir de uma biomassa do Cerrado Brasileiro por meio de extração oxidativa e modificações químicas. Em seguida, foi caracterizado física e bioquimicamente a fim de se obter sua composição físico-química e toxicológica para sugestão de aplicação na promoção da saúde humana em produtos como dispositivo natural de auxílio no controle de peso pela redução de apetite, dispositivos de liberação de fármacos, base para produtos cosméticos, espessantes alimentícios, entre outros.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é otimizar o processo de obtenção do biogel superabsorvente obtido a partir do hidrogel natural de *Magonia pubescens* St.Hil (Tingui) e avaliar suas potencialidades na área da saúde humana como veículo para incorporação de fármacos, bases cosméticas, inibidores de apetite e curativos de uso tópico.

Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- Otimizar a extração e purificação do hidrogel obtido de *Magonia pubescens* St.Hil;
- Caracterizar biológica e quimicamente o produto final;
- Avaliar as propriedades mecânicas;
- Avaliar a potencialidade do biogel como veículo de incorporação de fármacos;
- Avaliar a utilização do biogel como veículo para moléculas fotoativas (C-Dot) utilizadas no tratamento de leishmaniose;
- Testar o biogel como dispositivo auxiliar de inibição de apetite.

CAPÍTULO 1

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO HIDROGEL NATURAL DO ENVOLTÓRIO DE *MAGONIA PUBESCENS ST.HIL*

1 Introdução

As questões ambientais, econômicas e sociais somadas ao uso maciço de recursos fósseis encorajam pesquisas intensivas sobre a utilização de matérias-primas substitutas para produção de energia, materiais e produtos químicos. Nesse aspecto, as indústrias baseadas em materiais, produtos químicos e combustíveis sustentáveis dependem principalmente da biomassa lignocelulósica, a qual é formada majoritariamente por lignina, celulose e hemiceluloses. Esses recursos são abundantemente disponíveis, relativamente bem distribuídos em todo o mundo e podem aliviar os conflitos de alimentos *versus* energia; uso de recursos renováveis *versus* esgotamento de recursos fósseis (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016).

Um foco deste conflito pode ser apontado no interior do Brasil, num importante bioma que abriga as principais fontes de água subterrânea e recursos vegetais. O Cerrado brasileiro sofre constantes impactos que podem resultar na extinção de várias espécies nativas (STRASSBURG et al., 2017). Uma alternativa de preservação desses recursos é a exploração científica de espécies pouco conhecidas atendendo ao conceito de biorrefinarias, com geração mínima de resíduos e aproveitamento integral de toda a massa vegetal. A espécie escolhida para a execução deste projeto é o Tinguí (*Magonia pubescens*), um fruto da família das sapindaceae. Seus usos na medicina popular são para tratar úlceras, utilizando-se as sementes, feridas, utilizando-se a casca e como calmante, pelo uso das raízes. A resina da casca é tida como inseticida e usada contra piolhos e as cinzas e sementes são também aproveitadas na fabricação caseira de sabão (GUARIM NETO, GERMANO ; SANTANA, 2000; SILVA JUNIOR, 2006). A espécie pode ainda ser indicada para plantios de áreas degradadas de preservação permanente (MACEDO et al., 2009a) e seus frutos e sementes são muito utilizados por artesãos regionais na fabricação de utensílios domésticos e peças ornamentais. Sua madeira é dura, resistente ao

ataque de organismos xilófagos¹ e, por isso, usada na construção civil ou ainda para fins energéticos como lenha e carvão (LORENZI, 2009; PAULA, J. E. DE; ALVES, 1997).

A partir desta biomassa, vários processos podem ser pensados, tanto no desenvolvimento de novos materiais quanto na geração de energia e insumos químicos. Uma característica peculiar desta espécie, é que a semente do fruto produz um hidrogel natural, cuja função no meio-ambiente é a reserva de água para favorecer a germinação, haja vista o grande período sem ocorrência de chuvas no Cerrado: em tempos de seca prolongada previne a desidratação e, na época das águas, a mucilagem envolve as sementes protegendo-a da deficiência de oxigênio (Joly et al., 1980; Salgado-Labouriau, 1973).

Na literatura, o fruto do Tingui foi estudado como matéria-prima para o desenvolvimento de condicionadores de solo, sendo capaz de elevar a quantidade de água total disponível em 71% e diminuir a lixiviação de nutrientes disponíveis no solo (VILELA, 2017). Em outra pesquisa, foi ainda desenvolvido um hidrogel superabsorvente a partir da modificação química do hidrogel natural presente no envoltório da semente, o qual foi capaz de absorver água 80 vezes seu próprio peso, sendo um substituto em potencial para hidrogéis sintéticos de uso em fraldas descartáveis e aplicações médicas como dispositivos de liberação controlada de fármacos (VIEIRA, 2015). Em suma, esta espécie ainda pouco explorada apresenta grande potencial de aplicação em vários produtos, necessitando ainda mais de pesquisas e projetos.

Técnicas que atendem os preceitos da química verde também são preteridas para o desenvolvimento destes novos materiais que se tornaram o foco de muitos pesquisadores pois, devido às suas propriedades físicas, químicas e biológicas podem ser aplicados em áreas bastante diversificadas. Os polímeros hidrofílicos mais comuns no mercado são produzidos a partir de recursos de petróleo e a sua utilização e consequente acúmulo como resíduo sólido urbano traz impactos ao meio ambiente. Em resposta a esta situação, o uso de recursos renováveis na produção destes polímeros tornou-se o foco das biorrefinarias, que pode oferecer

¹ Organismos que se alimentam da madeira.

recursos abundantes e de baixo custo de produção, além de fatores como biodegradabilidade e biocompatibilidade.

Essencialmente, os hidrogéis são definidos como um polímero capaz de absorver de 100 até 500 vezes seu próprio peso em solventes e fluidos biológicos sem que sofra dissolução e suas cadeias (CHANG; ZHANG, 2011; FERREIRA et al., 2018; KOEHLER; BRANDL; GOEPFERICH, 2018; KONO; FUJITA, 2012; MAHINROOSTA et al., 2018). Essa classe de materiais pode ser subdividida ainda de acordo com a origem de sua matéria-prima em artificiais e naturais, sendo esta largamente pesquisada para fins médicos principalmente devido a biocompatibilidade já conhecida de muitos precursores de hidrogéis, como os polissacarídeos, por exemplo, os quais tem como representante a celulose e quitina (MAHDAVINIA et al., 2018). A seguir, são apresentadas as principais características dos hidrogéis naturais:

1.1. Hidrogéis de Fontes Naturais

A maioria dos tecidos de animais e plantas são hidrogéis (BAI et al., 2019). Os hidrogéis naturais podem ser subdivididos em dois grupos principais de acordo com sua fonte: hidrogéis à base de polissacarídeos e hidrogéis a base de polipeptídios (AHMED, 2015). A celulose, polissacarídeo mais abundante do planeta, é frequentemente utilizada na obtenção de hidrogéis superabsorventes. Um exemplo é a nanocelulose bacteriana, já utilizada no mercado como Epicitehydro (Alemanha) e Celmat (Polônia) para tratamento de queimaduras, feridas crônicas, edema e como produto cosmético (Figura 1). Mais recentemente, em algumas aplicações, a nanocelulose bacteriana mostra potencial para superar as celulosas atualmente usadas na indústria alimentícia como um novo aditivo hidrocolóide (KLEMM et al., 2018).

Além de ecologicamente correta, a celulose e seus derivados produzem hidrogéis de baixo custo, representando um substituto viável para materiais à base de petróleo (CHANG; ZHANG, 2011; CHOE et al., 2018). Além disso, sua alta afinidade por solventes aquosos e adaptabilidade de suas estruturas químicas permitem o desenvolvimento de materiais funcionalizados que podem atender a uma multiplicidade de requisitos, característica muito requerida para aplicações biomédicas, já que seus metabólitos são suscetíveis à digestão enzimática no corpo humano (GYLES et al., 2017; VARAPRASAD et al., 2017; XU et al., 2015).



Figura 1. Exemplo de hidrogéis de nanocelulose comercialmente disponíveis. **Fonte:**(BOWIL, 2018; JENACELL, 2018)

Outro polissacarídeo muito referenciado na preparação de hidrogéis é a quitosana, (1-4)-2-amino-2-desoxi- β -d-glucana, obtido da hidrólise alcalina de quitina, um dos amino-polissacarídeos naturais mais abundantes extraídos do exoesqueleto de crustáceos e insetos. Os grupos amina ($-\text{NH}_2$) e hidroxila ($-\text{OH}$) presentes ao longo da cadeia de quitosana podem ser usados como grupos funcionais reticuláveis, além disso, abaixo de pH 6,3 os grupos amina podem ser facilmente convertidos em grupos amônio, tornando a quitosana um candidato ideal para uso na preparação de hidrogéis sensíveis ao pH. Além da não-toxicidade e biocompatibilidade, a quitosana pode ser degradada *in vivo* por várias enzimas, principalmente por lisozima, uma protease inespecífica presente em todos os tecidos de mamíferos (LI et al., 2017b; SANTOS MENEGUCCI et al., 2015; SZYMAŃSKA; WINNICKA, 2015).

Dos polímeros naturais, as proteínas são as matérias-primas menos utilizadas devido suas aplicações industriais avançadas. As proteínas têm sido estudadas como materiais de partida eficazes para a fabricação de diversos biomateriais, como filmes e compósitos. Nos últimos anos, os hidrogéis à base de proteína fibrosa tornaram-se populares devido à sua similaridade estrutural e mecânica com a matriz extracelular, alta compatibilidade biológica que pode ativar respostas celulares precisas e sua capacidade de processamento relativamente simples sob condições brandas. Além disso, esses hidrogéis podem ser degradados no organismo por enzimas proteolíticas (LIAROU et al., 2018; VARAPRASAD et al., 2017).

De acordo coma literatura, as vantagens da obtenção de hidrogéis a base de matéria-prima natural são sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade e abundância na natureza. Em contrapartida, esses materiais, pela sua constituição natural, podem conter agentes

patogênicos ou desencadear respostas inflamatórias não desejáveis (AOUADA; MATTOSO, 2009). Devido a este fato, são necessárias etapas de purificação criteriosa a fim de remover tais empecilhos. A seguir são apresentados os métodos de purificação mais reportados na literatura.

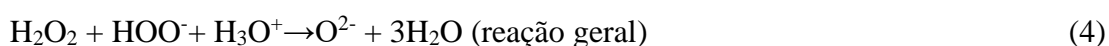
1.2. Métodos de Extração de Celulose

Pré-tratamentos alcalinos utilizando hidróxido de sódio e amônia aquosa são os mais eficientes para remoção de lignina em comparação a outros pré-tratamentos. Nestes processos, a amônia aquosa pode ser reciclável por causa de sua alta volatilidade e não corrosivo, entretanto, a grande quantidade de licor negro produzida é de difícil recuperação, podendo ainda causar grandes danos ambientais (LI et al., 2017a). Tratamento organossolv também é uma das estratégias mais utilizadas para recuperar a fração de lignina da biomassa sem degradação significativa da celulose (MARTÍNEZ-PATIÑO et al., 2017a).

Contudo, a oxidação química tem sido a técnica de despolimerização e degradação da lignina predominante empregada nos modernos processos comerciais de polpação e branqueamento de celulose (MA; GUO; ZHANG, 2018). O peróxido de hidrogênio é um agente oxidante forte e um solvente verde, que é comumente usado no branqueamento de celulose (LI et al., 2017a). Ma e colaboradores (2018) comparou o processo de deslignificação por peróxido na laminação do grafite, onde há forte interação π - π entre as camadas de grafeno. Quando tratadas com este agente oxidante, a adição de oxigênio enfraquece a força de empacotamento exercida pelas interações π - π , levando à expansão das camadas de grafeno. A oxidação da lignina pode trazer um ou mais oxigênio para a cadeia lateral da lignina e/ou anel aromático, o que pode instigar um mecanismo similar para reduzir as forças inter-unidades. Unidades fenilpropanóides na lignina são ligadas por ligações éter e C-C, com ligações éter - predominantemente α -O-4 e β -O-4 - sendo mais abundantes na maioria das ligninas vegetais. A clivagem oxidativa dessas ligações introduzirá mais grupos funcionais contendo oxigênio, como aldeídos, cetonas e carboxilas no fragmento de lignina resultante. Um aumento nos grupos funcionais ricos em oxigênio no fragmento de lignina também pode aumentar a distância entre os anéis empilhados π - π e, assim, enfraquecer as forças inter-unidades que mantêm a lignina junta, facilitando a dissociação desta macromolécula (MA; GUO; ZHANG, 2018; MA; XU; ZHANG, 2015).

O uso de peróxido de hidrogênio em meio alcalino também tem sido descrito como um efetivo pré-tratamento que promove a despolimerização da lignina pela ação oxidativa de

radicais derivados do H_2O_2 (MARTÍNEZ-PATIÑO et al., 2017a). Para determinação de uma condição ótima, as variáveis mais influentes são concentração do peróxido, concentração de sólidos e tempo de pré-tratamento. Gould (1985) descreve o mecanismo de deslignificação a partir de H_2O_2 em meio básico da seguinte maneira: Em pH alcalino, a dissociação do peróxido de hidrogênio forma o ânion hidroperóxido (HOO^-) que em pH 11,5 pode reagir com o H_2O_2 não dissociado formando radicais hidroxila altamente reativo (OH^\cdot) e superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Na ausência de outros reagentes, radicais hidroxílicos e superóxidos reagem entre si formando oxigênio e água. As reações envolvidas neste mecanismo são definidas nas equações de 1 a 4.



A diminuição na eficiência da deslignificação em pH diferente de 11,5 sugere que a oxidação direta da lignina pelo HOO^- não é viável, já que a concentração deste ânion na mistura reacional seria aumentada em pH maiores que 11,5 e isso ao invés de levar a um aumento da deslignificação acaba gerando uma diminuição (RABELO et al., 2014).

2 Materiais e Métodos

2.1. Coleta e Amostragem dos frutos de *Magonia Pubescens*

As coletas foram realizadas na região do Parque Municipal do Itiquira e zona rural do distrito de Bezerra, ambas pertencentes ao município de Formosa-GO e zona rural do município de Paracatu-MG durante os meses de frutificação da espécie (julho a setembro). Os frutos maduros foram retirados das árvores de forma manual e a casca separada das sementes *in loco* (Figura 2), de modo que, para este trabalho, fossem aproveitadas somente as sementes.

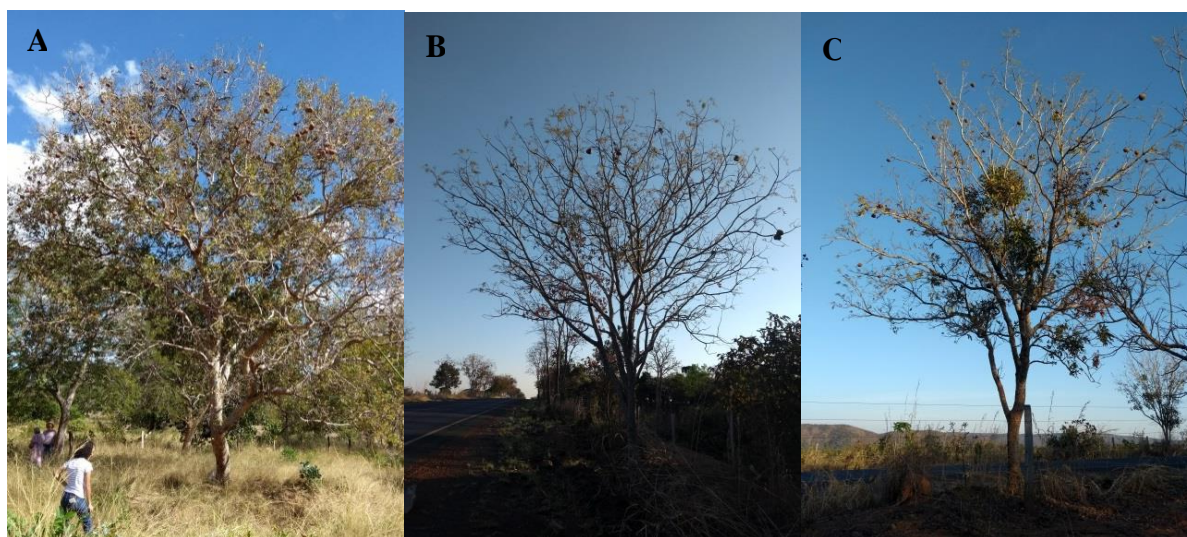


Figura 2. Coleta dos frutos nos pontos de amostragem: Distrito de Bezerra (A), Parque Nacional do Itiquira (B), zona rural de Paracatu, MG (C). **Fonte:** o autor

2.2. Métodos de Extração do Hidrogel Natural do Envoltório de *Magonia Pubescens*

As sementes foram previamente secas em estufa a 40 °C por um período de 12h a fim de evitar o crescimento de fungos em suas superfícies e posteriormente separadas dos envoltórios. Foram empregados dois procedimentos de obtenção do gel: o primeiro, de acordo com metodologia já descrita por Vieira (2015) onde os envoltórios foram moídos em Moinho de Facas tipo Willye - Fortinox modelo STAR FT-82/2 - resultando num material de granulometria de 20 a 30 Mesh, e o segundo por meio do intumescimento do envoltório por um período médio de 12h em água destilada seguido de separação mecânica do hidrogel das camadas mais externas do envoltório da semente de *Magonia Pubescens*. As etapas de separação por via úmida do hidrogel são demonstradas pela Figura 3. Os produtos resultantes foram chamados de Biogel e nomeados BEU *in natura* para o obtido por raspagem mecânica em via úmida e BES *in natura* para o envoltório moído e obtido por via seca.

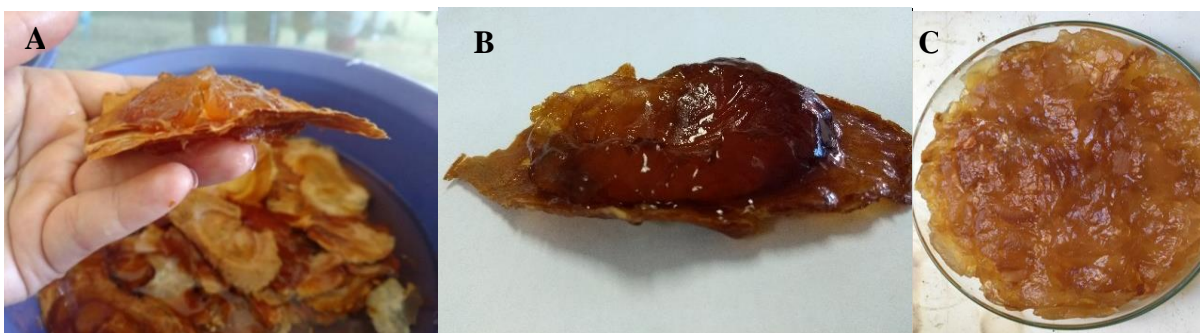


Figura 3. Processo de extração do hidrogel natural de *Magonia Pubescens* do envoltório da semente por via úmida (BEU): Intumescimento (A), raspagem (B) e gel *in natura* (C). **Fonte:** O autor

2.3. Métodos de Purificação do Hidrogel *in natura*

Esta etapa visa purificar os biogéis *in natura* obtidos do envoltório da semente de *Magonia Pubescens* de forma que não haja prejuízos às suas características de absorção de água. Com o objetivo de classificar cada um dos tratamentos como agressivo ou não para os constituintes do biogel, foram realizados testes de intumescimento com o material após as extrações oxidativas. Se o gel apresentasse intumescimento, cada um dos tratamentos seria conduzido às etapas posteriores de reticulação. Caso resultado fosse negativo, o tratamento seria descontinuado.

2.3.1. Tratamento com Clorito de Sódio 30%

Em balança de precisão de $\pm 0,1$ mg, 10,0 g dos envoltórios previamente triturados e peneirados foram pesados e transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL, juntamente com 10 mL de solução de Clorito de sódio 30% (m/v) e 10 mL de solução de Ácido Acético 1:5 (v/v). O Erlenmeyer foi tampado com outro de 125 mL invertido sobre o primeiro e o conjunto levado a aquecimento em banho termostatizado a 70 ± 5 °C. A adição das soluções de NaClO_2 e CH_3COOH foi repetida a cada intervalo de 45 minutos por no mínimo 3 vezes ou até que toda a massa estivesse uniformemente branqueada. A mistura foi resfriada até 5°C e filtrada em cadinho de placa sinterizada (n. °2). O material resultante foi lavado com solução de tiosulfato de sódio 5% (remoção de cloro residual) e em seguida exaustivamente com soluções de água destilada e álcool etílico, ambos a pH 4,0 e água destilada até a neutralidade do filtrado.

2.3.2. Tratamento com Peróxido de Hidrogênio

A metodologia foi adaptada dos estudos de Martínez-patiño (2017) e Cheng (2016) e colaboradores, onde é utilizada diversas concentrações de peróxido de hidrogênio a fim de remover lignina do material estudado. Neste estudo, 1,0g de amostra foi submetida a duas concentrações diferentes de peróxido 7,0 e 20% (v/v) em duas faixas de pH, 11,5 e 10 a uma temperatura fixa de 60 °C em banho termostaticado. O volume utilizado de cada solução foi de 30 mL, quantidade suficiente para que todo o material ficasse completamente intumescido. Após o período de 60 minutos, a mistura foi resfriada e filtrada em cadinho de vidro com placa porosa. A holocelulose resultante foi exaustivamente lavada com água destilada até a neutralidade do filtrado e posteriormente seca até peso constante. Todos os tratamentos foram realizados tanto para BEU *in natura* quanto para BES *in natura*.

Para o delineamento dos experimentos, foi utilizado um modelo de planejamento fatorial 2², nos dando um quantitativo de 04 experimentos a serem realizados para cada tratamento. Os experimentos foram realizados em triplicata e aleatorização foi adotada visando evitar a propagação de erros e a consequente distorção estatística dos resultados. O planejamento apresentou as características demonstradas nas Tabelas 1 e 2 e os produtos gerados foram chamados de biogéis extraídos por via úmida (BEU) e biogéis extraídos por via seca (BES). Todas as reações foram realizadas em triplicata.

Tabela 1. Níveis e fatores do planejamento 2²

	Fatores	Níveis	
		+	-
1	pH	11,5	10
2	Concentração H ₂ O ₂ (%)	20	7

Tabela 2. Matriz dos experimentos e aleatorização dos ensaios de purificação dos Hidrogéis

Experimentos	Matriz dos experimentos		Ordem de realização dos ensaios		
	1	2	1	2	
1	-	-	10	7	4
2	+	-	11,5	7	2
3	-	+	10	20	1
4	+	+	11,5	20	3

2.4. Secagem dos Biogéis

Posteriormente a purificação, os biogéis foram submetidos a dois processos de secagem distintos: secagem a pressão e temperatura reduzida, utilizando para este fim um liofilizador da marca Terroni modelo L3000; e secagem em estufa a temperatura controlada de 60 ± 2 °C. As amostras secas em liofilizador foram classificadas como grupo A e, em estufa, em B. O fluxograma de preparação dos biogéis pode ser acompanhado na Figura 4.

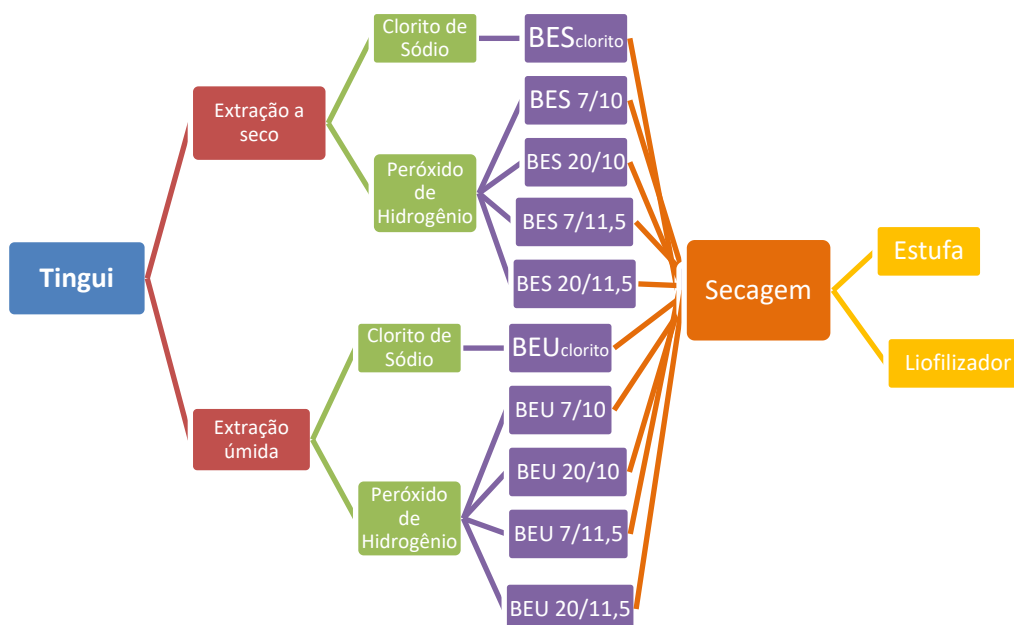


Figura 4. Fluxograma de preparação dos biogéis de *Magonia pubescens* **Fonte:** o autor

Para facilitar o entendimento e identificação dos produtos, a nomenclatura dos biogéis obtidos após as purificações são apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1: Nomenclatura dos biogéis após a purificação oxidativa

Produto	Característica da Purificação
BEU 7/10	Biogel extraído por via úmida e purificado com 7% de Peróxido de Hidrogênio em pH 10
BEU 20/10	Biogel extraído por via úmida e purificado com 20% de Peróxido de Hidrogênio em pH 10
BEU 7/11,5	Biogel extraído por via úmida e purificado com 7% de Peróxido de Hidrogênio em pH 11,5
BEU 20/11,5	Biogel extraído por via úmida e purificado com 20% de Peróxido de Hidrogênio em pH 11,5
BES 7/10	Biogel extraído por via seca e purificado com 7% de Peróxido de Hidrogênio em pH 10
BES 20/10	Biogel extraído por via seca e purificado com 20% de Peróxido de Hidrogênio em pH 10

 Continuação Quadro 1:

BES 7/11,5	Biogel extraído por via seca e purificado com 7% de Peróxido de Hidrogênio em pH 11,5
BES 20/11,5	Biogel extraído por via seca e purificado com 20% de Peróxido de Hidrogênio em pH 11,5
BEU clorito	Biogel extraído por via úmida e purificado com clorito de sódio 30%
BES clorito	Biogel extraído por via seca e purificado com clorito de sódio 30%

2.5. Análise do Teor Residual de Cloro Total

O teor de cloro residual foi avaliado após o tratamento com clorito de sódio 30% a fim de se verificar a eficiência da lavagem do produto final. A técnica empregada foi colorimétrica utilizando o método DPD (N, N-dietil-p-fenilenodiamina) e a leitura realizada em clorímetro digital CL-800 da tecnopon.

2.6. Caracterização Físico-Química dos Biogéis

2.6.1. Holocelulose

A Holocelulose foi determinada segundo procedimento descrito por Browning (1963). Em balança de precisão de $\pm 0,1$ mg, 2,0 g de material previamente seco a 105 ± 2 °C foi pesado e transferido para um Erlenmeyer de 125 mL, juntamente com 2,0 mL de solução de Clorito de sódio 30% (m/v) e 2,0 mL de solução de Ácido Acético 1:5 (v/v). O Erlenmeyer foi tampado com outro de 25 mL invertido sobre o primeiro e o conjunto levado a aquecimento em banho termostatzado a 70 ± 5 °C. A adição das soluções de clorito de sódio e ácido acético foi repetida a cada intervalo de 45 minutos, totalizando 5 vezes. A mistura foi resfriada até 5°C e filtrada em cadinho de vidro com placa porosa (previamente seco e tarado). A Holocelulose resultante foi lavada repetidas vezes com água fria e uma vez com metanol e, posteriormente, seca em estufa a 105 ± 2 °C até peso constante.

2.6.2. Celulose

O teor de celulose foi determinado de acordo com o descrito por Kennedy e colaboradores (1987): em balança de precisão ($\pm 0,1$ mg) cerca de 1,0 g de holocelulose anteriormente preparada e seca foi pesada e transferida para cápsula de porcelana. A ela foi adicionado 15 mL de solução de hidróxido de potássio 24% (m/v) e a mistura resultante deixada sob agitação por 15 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, filtrou-se em cadinho de

placa porosa (previamente seco e tarado) e o resíduo remanescente foi lavado por duas vezes com solução de ácido acético 1%, até atingir a neutralidade com água destilada e, por último, com etanol. A celulose foi submetida a secagem em estufa a 105 ± 2 °C até peso constante.

2.6.3. Hemicelulose

A hemicelulose foi determinada pela diferença, onde a soma da celulose e hemicelulose é equivalente a quantidade de holocelulose.

2.6.4. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho - FTIR

Para a obtenção dos espectros foi utilizado um espectrômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier IRPrestige-21 da Shimadzu e as amostras analisadas segundo a técnica de pastilha de brometo de potássio (KBr) (10:100 mg). As amostras foram previamente secas em estufa a 105 ± 2 °C por 2 horas para eliminação da umidade e homogeneizadas, juntamente com KBr também seco, em almofariz de quartzo. Em seguida, moldadas manualmente em forma de pastilhas com a ajuda de uma prensa hidráulica. As pastilhas resultantes foram então submetidas a leitura no equipamento e os gráficos obtidos, tratados por intermédio do software Microcal™ Origin® versão 8.0.

2.6.5. Análises Térmicas

2.6.5.1. Análise Termogravimétrica (TG) e Análise Termogravimétrica Diferencial (DTG)

As curvas de TG/DTG foram obtidas em um analisador simultâneo modelo SDT-2960 da TA Instruments com taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, com fluxo de nitrogênio de 100 mL por minuto, iniciando a temperatura ambiente (25°C) a 700°C, faixa média utilizada para materiais lignocelulósicos. Foram ainda utilizadas para todo o experimento panelinhas de platina e aproximadamente 15 mg de amostra em cada corrida.

2.6.6. Análise Elementar – CHN

Para as análises elementares dos materiais, foi utilizado um analisador Perkin Elmer Series 2400II CHN através do qual se obtiveram as frações em massa dos principais elementos

que compõe a biomassa: Carbono (C), Hidrogênio (H) e Nitrogênio (N). O teor de Oxigênio (O) foi obtido por diferença.

2.6.7. Grau de Intumescimento (Q)

As propriedades hidrofílicas dos biogéis foram definidas de acordo com o grau de intumescimento (Q), que é a capacidade de absorção de água e/ou fluidos biológicos dos produtos. Os valores de Q foram determinados segundo metodologia JIS – Padrão Industrial Japonês K7223, descrita por Yoshimura, Matsuo e Fujioka (2006) a qual utiliza folhas de nylon de porosidade de 255 Mesh e dimensões de 100 mm x200 mm para a realização dos ensaios. 100 mg dos materiais foram introduzidas em saquinhos produzidos a partir das folhas de nylon e estes imersos em água a 25°C. Os biogéis foram deixados em solução até que atingissem peso constante. A capacidade de absorção de água, ou grau de intumescimento (Q), foi calculada usando a Equação 5.

$$Q = \frac{P_i - P_b - P_s}{P_s} \quad (5)$$

Onde: P_i é o peso do sachê com os biogéis intumescidos; P_s os pesos do biogel seco e P_b é o peso do saquinho de chá em branco depois de imerso em água.

2.6.8. Análises Texturais - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a realização das análises morfológicas em Microscópio Eletrônico de Varredura, todas as amostras foram previamente liofilizadas e metalizadas com ouro em suportes de alumínio (stubs) fixadas com fita de carbono dupla face e colada sobre uma película de papel alumínio. As análises texturais de microscopia e área superficial foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura modelo JSM-7001F da Jeol no laboratório de Microscopia do Instituto de Biologia, UnB.

2.7. Caracterização Bioquímica dos biogéis purificados por via seca e úmida

Já é conhecido pela literatura que o hidrogel natural de *magonia pubecens* é formado por carboidratos. A fim de conhecer esses carboidratos que compõe a estrutura do hidrogel, foram realizadas algumas análises investigativas, tais como a pesquisa por presença de pectina e a determinação de açúcares, por cromatografia líquida.

2.7.1. Carboidratos Estruturais

2.7.1.1. Pectinas

A pectina refere-se a uma família de oligossacarídeos e polissacarídeos, cujo esqueleto péctico é primariamente um homopolímero de ácido galacturônico ligado em $\alpha(1\rightarrow4)$, com grau variável de grupos carboxilas metil esterificados. Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura) e EU (União Europeia) a pectina deve ser constituída de, no mínimo, 65% de ácido galacturônico (CANTERI; WOSIACKI; SCHEER, 2012).

A prova qualitativa da presença de pectina foi realizada de acordo com metodologia sugerida pelas Normas Analíticas do Instituto Adolf o Lutz (IAL, 2008) a qual utiliza 30 g da amostra em 200 mL de água aquecida. Uma alíquota dessa solução foi adicionada em solução de permanganato de potássio a 0,25% e aquecida até a ebulição. O desenvolvimento de uma cor intensa com fluorescência esverdeada é indicação da presença de pectinas.

2.7.1.2. Açúcares por Cromatografia Líquida - HPLC

A quantificação desses carboidratos consiste na hidrólise com ácido forte concentrado para a quebra total dos carboidratos a seus componentes monoméricos. Para a hidrólise ácida, são pesados 0,30 g de amostra com umidade inferior a 10%. As amostras foram transferidas para tubos de ensaio e em seguida colocados em um banho termostático a 30 °C. A cada tubo são acrescentados 3,0 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m) e, com o auxílio de bastões de vidro, o conteúdo dos tubos foi agitado moderadamente a cada intervalo de 10 minutos.

Após 60 minutos, os tubos são retirados do banho e transferidos para tubos de penicilina acrescidos de 84,0 mL de água destilada, agitando-os vigorosamente após fechamento dos mesmos. Em seguida, os tubos lacrados são levados para autoclave por 60 minutos à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm.

Após o resfriamento, as frações líquidas são coletadas, neutralizadas e centrifugadas para a determinação dos carboidratos estruturais presentes no material analisado. O sobrenadante é filtrado em filtro para seringa de 0,22 μm e quantificado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC – *High Performance Liquid Chromatograph*). O equipamento utilizado deve ser equipado com detector do tipo RID (índice de refração) e as

amostras são injetadas e eluídas através de uma coluna Aminex HPX-87H, utilizando ácido sulfúrico $0,005 \text{ mol/L}^{-1}$ como fase móvel a um fluxo de $0,6 \text{ mL/min.}$, de acordo com o protocolo estabelecido para açúcares pelo Laboratório de Química de Biomassa da Embrapa Agroenergia.

2.7.2. Quantificação de Glicose

Os testes para quantificação de glicose foram feitos a partir da hidrólise ácida dos biogéis. As reações foram conduzidas em sistema fechado a 120°C com pressão autogerada, utilizando frascos de penicilina de 50 mL lacrados. A metodologia utilizada foi descrita por Grossi (2015) onde foi utilizado 0,5 g de amostra e a concentração das soluções de ácido sulfúrico variada de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10% com tempos de 60 e 120 minutos. Na Tabela 3 estão presentes as condições reacionais para cada experimento.

Tabela 3. Condições reacionais da hidrólise ácida para cada determinação de glicose nos biogéis

Biomassa	Extração	Massa (g)	Concentração Ácido (%)	Tempo (min.)
BES	<i>in natura</i>	0,5025	0,5	60
BES	<i>in natura</i>	0,5019	0,5	120
BEU	<i>in natura</i>	0,5021	0,5	60
BEU	<i>in natura</i>	0,5011	0,5	120
BES	peróxido	0,5012	0,5	60
BES	peróxido	0,5012	0,5	120
BEU	peróxido	0,5045	0,5	60
BEU	peróxido	0,5013	0,5	120
BES	<i>in natura</i>	0,5063	1,0	60
BES	<i>in natura</i>	0,5027	1,0	120
BEU	<i>in natura</i>	0,5039	1,0	60
BEU	<i>in natura</i>	0,5019	1,0	120
BES	peróxido	0,5018	1,0	60
BES	peróxido	0,5038	1,0	120
BEU	peróxido	0,5031	1,0	60
BEU	peróxido	0,503	1,0	120

Após a hidrólise, em tubo de ensaio de 10 mL, 30 μL de hidrolisado são juntados a 3 mL de reagente enzimático (solução contendo tampão pH 7,0; fenol; 4-aminoantipirina; azida sódica; glicose oxidase e peroxidase) e colocados em banho-maria, a 37°C , por 10 minutos. O

teste em branco é feito utilizando apenas 3,0 mL de reagente enzimático e o padrão é preparado com reagente enzimático acrescido de solução de glicose 5,56 mmol.L⁻¹.

Neste teste, o peróxido de hidrogênio, em presença da peroxidase (POD) reage com a 4 - aminoantipirina e Fenol, formando um cromógeno vermelho cereja cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose. A concentração de glicose é determinada em UV-vis em 505 nm a partir da Equação 6.

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100 \quad (6)$$

3 Resultados e Discussão

Para a obtenção dos biogéis foram aplicadas duas metodologias de purificação: a primeira com clorito de sódio 30% e a segunda com peróxido de hidrogênio alcalino, utilizando duas concentrações diferentes: 7 e 20%. Após a realização desta etapa, os géis foram testados quanto sua capacidade de intumescimento a fim de se verificar se os mesmos não haviam perdido suas propriedades de absorção. Caso não apresentassem mais esta propriedade, os tratamentos eram considerados impróprios para a purificação, já que descaracterizaria o hidrogel.

No tratamento com clorito em meio ácido, ocorre liberação de gás cloro que, combinado com água, forma ácido clorídrico e ácido hipocloroso, além da própria dissolução do sal. Este é um tipo de extração que deixa resíduos de cloro no material e, a fim de diminuir a concentração desse reagente no produto final, foi adicionada uma etapa extra de lavagem com solução de tiosulfato de sódio 5%.

A quantificação do porcentual de cloro foi realizada através de teste colorimétrico com DPD, onde o Cloro Livre (Cl₂), ácido hipocloroso (HClO) e íons hipoclorito (ClO⁻) reagem com o DPD na faixa de pH 5,5 – 6,5 para formar um complexo rosa. O objetivo aqui foi determinar as concentrações de todas essas espécies de cloro e o resultado é demonstrado da Tabela 4.

Tabela 4. Quantificação dos teores de cloro total nos biogéis purificados com clorito

	Concentração de cloro residual (mg.L ⁻¹)	
	Biogel extraído por via Úmida	Biogel extraído por via Seca
Antes da lavagem com tiosulfato de sódio 5%	8,0 mg/L	7,3 mg/L
Após lavagem com tiosulfato de sódio 5%	0,5 mg/L	1,7 mg/L

Mesmo com 70% de redução do teor inicial (antes da lavagem com tiosulfato de sódio), estes valores de residual de cloro não estão referenciados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para aplicações de uso cosmético, entretanto, quando em contato com a pele, a presença deste elemento em sua forma ativa pode causar prejuízos ao usuário pelo surgimento de reações alérgicas. Na pele, pode provocar irritação, seguido de vermelhidão. Quando ingerido, causa irritação nas mucosas da boca e garganta, dores de estômago, e possível ulceração. Em alternativa a esta metodologia de purificação, foi proposto o tratamento com o segundo agente oxidante, peróxido de hidrogênio alcalino.

Em pH alcalino, a dissociação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) forma o ânion hidroperóxido (HOO). Em pH 11,5, este ânion reage com o H₂O₂ não dissociado formando um radical hidroxila (OH) e superóxido (O²⁻). Quando reagem entre si, radicais hidroxílicos e superóxidos formam oxigênio e água (GOULD, 1984), fatores que tornam este método de purificação de grande interesse na produção dos biogéis.

As concentrações de partida para iniciar os testes com o peróxidos foram extraídas, no geral, de metodologias de pré-tratamento de biomassa para produção de etanol de segunda geração, variando de 1,0 a 7,0% na proporção fixa de 1:25 (m/v) e temperatura de 60 °C (BOLADO-RODRÍGUEZ et al., 2016; MARTÍNEZ-PATIÑO et al., 2017b; SHIMIZU et al., 2018). Entretanto, concentrações abaixo de 7,0% não foram suficientes para branquear nenhum dos biogéis e 20% foi a concentração mínima encontrada para branquear BES. Foram testados também a variação de pH: sem adição de base e pH inferior a 10 que também não obtiveram sucesso com nenhum dos biogéis. O critério de avaliação, neste caso, foi a transparência do gel. Os testes realizados podem ser visualizados na Figura 5. A partir destes resultados, foi executado o planejamento dos experimentos.



Figura 5. Testes de purificações dos biogéis em pH e concentrações diferentes. **Fonte:** o autor

Para a avaliação da purificação com peróxido a partir do planejamento de experimento fatorial 2^2 , foram realizados testes da capacidade de absorção de água (Q) pelos biogéis bem como seu rendimento. A partir dos resultados obtidos, foram calculados os efeitos de cada fator (concentração de H_2O_2 , pH e a interação dos dois), ou seja, qual o impacto que a alteração de cada um causa no rendimento e grau de intumescimento do produto final. Todos os ensaios foram realizados com os dois biogéis: extraído por via seca e úmida. As Tabelas 5 e 6 demonstram o resultado de cada ensaio e, em seguida, as análises estatísticas multivariadas através dos Diagramas de Pareto (Figura 6 e 7) nos mostram quais dos fatores são variáveis significativas para a obtenção dos produtos.

Tabela 5. Coeficientes de contrastes, resultados de absorção de água dos BEU obtidos no fatorial 2^2 e Resultado dos testes da capacidade de absorção de água (Q):

Ensaio	pH	H_2O_2	Q (g/g)			Rendimento (%)			Efeitos em relação a Q			Efeitos em relação a Rendimento		
			Réplicas			Réplicas			H_2O_2	pH	pH/ H_2O_2	H_2O_2	pH	pH/ H_2O_2
1	-	-	126,44	156,44	174,10	62,93	60,00	61,30						
2	+	-	53,51	63,50	59,98	25,53	36,78	18,59	2,90	-4,05	2,63	5,16	-5,00	-2,89
3	-	+	185,17	137,02	146,28	34,47	32,18	35,73						
4	+	+	145,15	163,75	99,85	37,41	39,83	26,80						

Tabela 6. Coeficientes de contrastes, resultados de absorção de água dos BES obtidos no fatorial 2^2 e Resultado do Teste Q:

Ensaio	pH	H_2O_2	Q (g/g)			Rendimento (%)			Efeitos em relação a Q			Efeitos em relação a Rendimento		
			Réplicas			Réplicas			H_2O_2	pH	pH/ H_2O_2	H_2O_2	pH	pH/ H_2O_2
1	-	-	63,53	39,20	79,71	53,41	64,79	59,49						
2	+	-	72,65	76,53	51,98	41,64	41,00	41,85	-2,51	1,78	-5,44	-2,89	-5,00	5,16
3	-	+	56,42	50,51	24,67	47,40	51,05	40,30						
4	+	+	39,97	36,88	45,28	26,38	28,99	27,49						

Pela análise dos Diagramas de Pareto, tanto para os biogéis extraídos por via úmida quanto para os extraídos por via seca, a concentração da solução de peróxido e a variação de pH apresentaram efeito significativo na resposta de rendimento, com um R^2 superior a 75%, indicando a confiabilidade da interpretação estatística. Entretanto, somente para BEU a interação entre essas duas variáveis se mostrou significativa. Sabe-se que o hidrogel de *Magonia Pubecens* é composto basicamente de pentoses, açúcares não estruturais que compõem as hemiceluloses (SALGADO-LABOURIAU, 1973; VIEIRA, 2015). Estas, por sua vez, são muito sensíveis ao ataque básico e é solubilizada quando em presença de agente oxidante como o peróxido (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009; SHIMIZU et al., 2018; SILVA et al., 2015), o que justifica o impacto do pH no rendimento do produto final.

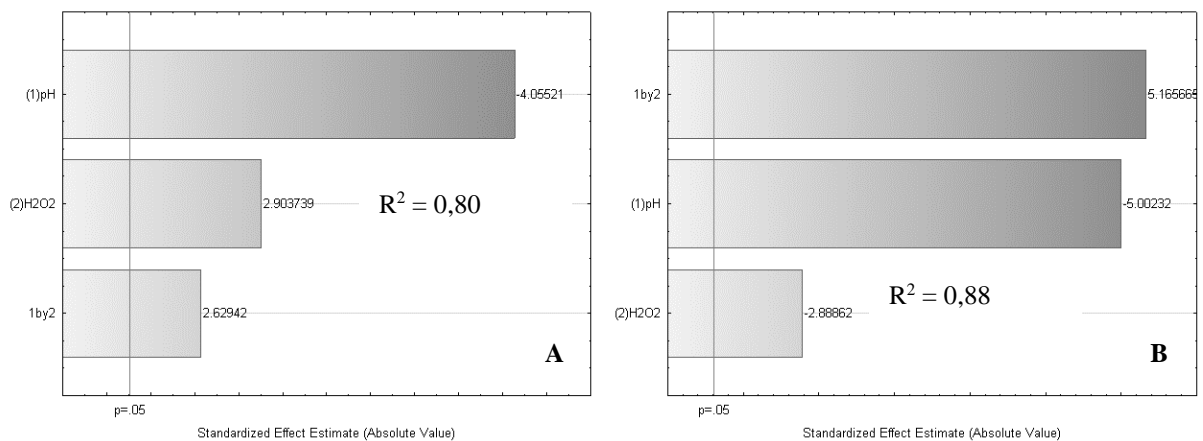


Figura 6. Diagrama de Pareto de BEU intumescido a temperatura ambiente mostrando a significância da concentração dos reagentes e variação de pH no desempenho (A) e rendimento (B) do produto final

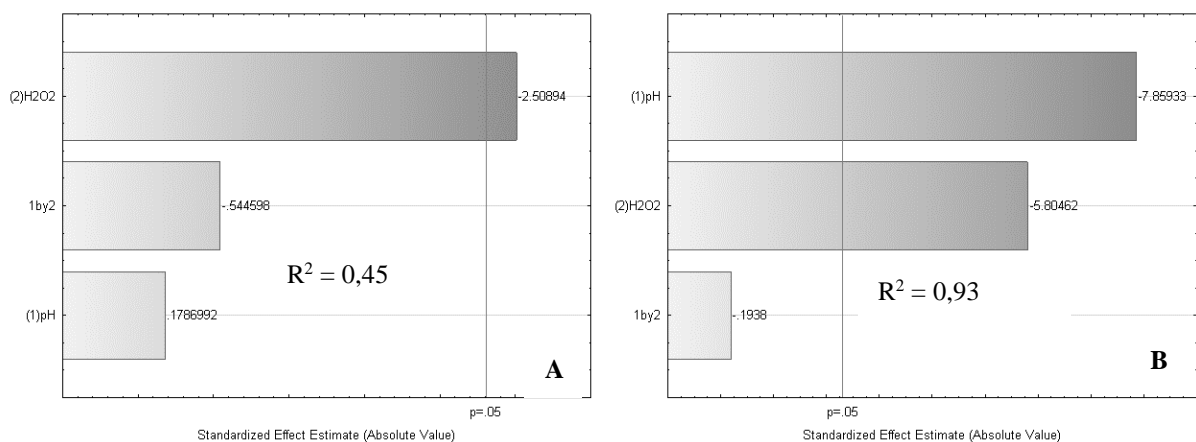


Figura 7. Diagrama de Pareto de BES intumescidos a temperatura ambiente mostrando a significância da concentração dos reagentes e variação de pH no desempenho (A) e rendimento (B) do produto final

Olhando para a resposta no grau de intumescimento dos materiais (Figura 6A), os ensaios que apresentaram diferença significativa tanto para o fator pH, quanto para concentração da solução de peróxido e a interação dos dois foi BEU, entretanto, para BES não é possível afirmar com certeza pois, estatisticamente, a resposta não obteve um grau de confiabilidade satisfatório. A comparação dos tipos de purificação entre os dois produtos (BEU e BES) quando a capacidade de absorção de água pode ser melhor visualizada graficamente, como demonstrado na Figura 8.

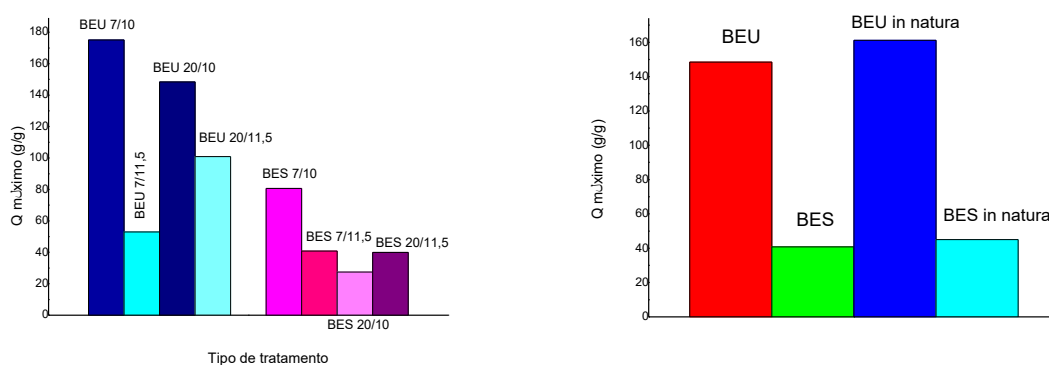


Figura 8. Análise gráfica comparativa entre os métodos de purificação e os biogéis extraídos por via seca e úmida

Quando se compara o grau de absorção de água dos biogéis purificados com os biogéis *in natura*, pode-se ainda concluir que a purificação não é agressiva, haja vista a absorção de água do BEU *in natura* é de 161 g/g e de BES *in natura* de 45 g/g.

O método de secagem também foi avaliado em relação ao grau de intumescimento e método de purificação. Para os materiais tratados com clorito de sódio 30%, os melhores resultados foram obtidos utilizando o processo de liofilização, no qual a secagem ocorre a baixa pressão e temperatura. A perda de água por secagem em estufa a 60 °C fez com que as camadas de celulose e holocelulose do hidrogel purificado se compactassem tornando-o com aspecto duro ou quebradiço. Além disso, observou-se uma coloração escura, indicando que o produto sofreu degradação a esta temperatura ou queima pelo ácido acético da lavagem que ainda possa ter ficado preso as cadeias do hidrogel intumescido. Resultados diferentes também não foram obtidos para os materiais tratados com peróxido de hidrogênio quando secos em estufa. A comparação do índice de absorção de água foi feita entre BEU 7/10 e BES 20/10 (Tabela 7), entretanto, o resultado não é satisfatório quando comparado a secagem em liofilizador.

Tabela 7. Média de absorção de água pelos biogéis em secagem a baixa pressão e temperatura (liofilizado) e estufa 60°C

	Absorção de água (g/g)	
	Secagem liofilizador	Secagem estufa
BEU	152,32	43,21
BES	67,05	21,30

A secagem em estufa dos biogéis extraídos com peróxido apresentou ainda algumas peculiaridades. Na operação de secagem, observou-se que a perda de água acontece de forma heterogênea, ocorrendo a separação do biogel da fração líquida (Figura 9). Este comportamento ocorreu com os dois produtos, independentemente da forma de extração. Outra observação importante foi que, quando secos, os biogéis adquirem a forma de um filme fino e quebradiço. A dificuldade de absorção de água para produtos que passam por este tipo de secagem pode ser justificada pelo possível empacotamento das camadas do biogel e conseqüentemente na dificuldade de permeação do solvente. Varaprasad e colaboradores (2017) explicam o processo de absorção de água pelos hidrogéis pela interação entre as redes de cadeias poliméricas e o solvente. A partir desta interação, as forças capilares, osmóticas e de hidratação são contrabalançadas, causando expansão das redes tridimensionais dos polímeros hidroretentores (VARAPRASAD et al., 2017). Por estes motivos descritos, foi escolhido o método de secagem através da liofilização (Figura 9B) para todos os experimentos subseqüentes.

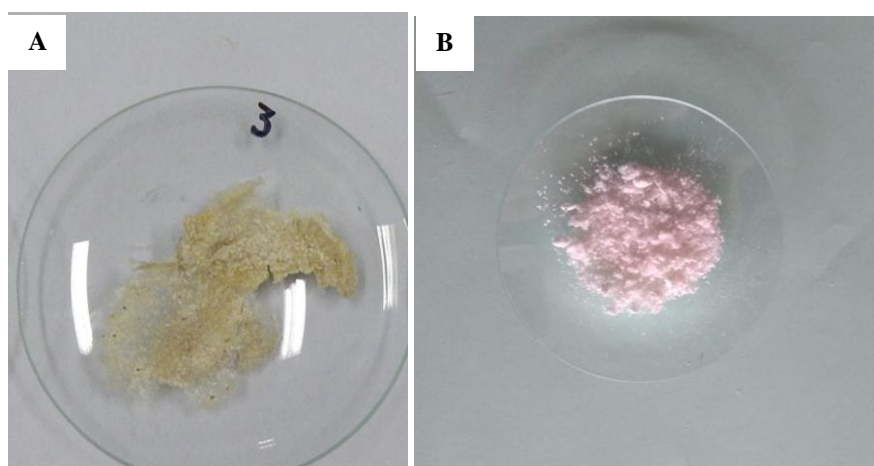


Figura 9. Comparações entre as operações de secagem dos biogéis: A)- secagem em estufa a 60°C e B)- secagem em liofilizador. **Fonte:** o autor

3.1. Caracterização físico-química dos biogéis purificados por via seca e úmida

3.1.1. Teor de celulose e hemicelulose

Os teores de hemicelulose e celulose dos biogéis purificados com peróxido alcalino e clorito de sódio acidificado são demonstrados na Tabela 8. As diferenças evidenciadas nos dois produtos se dão principalmente pelo método de extração dos biogéis do envoltório da semente de *Magonia Pubescens*. Enquanto em BES todo o envoltório é moído, em BEU o hidrogel é primeiramente intumescido e mecanicamente extraído, resultando em uma menor quantidade de celulose. A formação do hidrogel na semente ocorre na membrana externa, ou envoltório da semente, que é dividido em cinco diferentes regiões e a segunda mais externa é composta pelos açúcares formadores desse hidrogel (SALGADO-LABOURIAU, 1973), sendo esta a fração retirada na extração por via úmida.

Tabela 8. Teores de hemicelulose e celulose dos biogéis purificados com diferentes oxidantes

	Celulose (%)	Holocelulose (%)	Hemicelulose (%)
BES _{clorito}	54,23	63,72	9,49
BEU _{clorito}	23,37	51,36	27,99
BEU _{H2O2}	11,60	90,23	78,63
BES _{H2O2}	55,30	64,80	9,50

A diferença nos tratamentos oxidativos também são evidenciadas nesta análise. Para BES, a extração com clorito ou peróxido apresentaram teores de celulose muito próximos, podendo inferir que a mudança no agente oxidativo não é fator determinante para este parâmetro. Já para BEU, esta diferença foi bem maior, haja vista o tratamento com peróxido ser básico e, neste meio, as hemiceluloses são mais facilmente solubilizadas.

Entretanto, para efeitos de cálculos de quantificação de glicose e outras análises subsequentes que demandem estes teores, serão adotados os valores referentes ao produto extraído com peróxido alcalino, por se mostrar mais vantajoso em vários outros parâmetros analisados.

3.1.2. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho- FTIR

Os espectros (Figura 10A) dos biogéis *in natura* extraídos por via seca e úmida se apresentaram muito semelhantes quanto a composição de grupos funcionais, se diferenciando apenas pela intensidade dos sinais, como por exemplo, a banda em 1529 cm⁻¹ referente as

vibrações do anel aromático da lignina específicos do anel guaiacílico e grupos carbonilas (OLIVEIRA et al., 2017a), as quais aparecem bem evidenciadas em BES e em BEU. Por ter sofrido um processo de extração diferente, esta banda específica é mais atenuada. Entretanto, as bandas de absorção abaixo de 1000 cm^{-1} , específicas dos grupos hidroxílicos da celulose (JOHAR; AHMAD; DUFRESNE, 2011), permanecem muito parecidas em ambos os espectros. As bandas encontradas em 3375 cm^{-1} , referente ao estiramento das ligações de OH e 2900 cm^{-1} características de grupamentos CH presente nos materiais lignocelulósicos (ALSHEHRI et al., 2016; BAPTISTA; BORGES; FERREIRA, 2010), também é bastante intensa nos dois biogéis, já que são compostos de pentoses e hexoses, todos muito ricos em hidroxilas.

Para os biogéis purificados (Figura 10B), as diferenças entre os espectros se dá principalmente naqueles referentes aos estiramentos característicos dos componentes da lignina, como em 1529 cm^{-1} , no qual esta banda não é mais observada. A faixa em torno de 1700 cm^{-1} é atribuída aos grupos acetila e éster dos açúcares componentes da hemicelulose (JOHAR; AHMAD; DUFRESNE, 2011) e as bandas largas variando entre 1120 e 1000 cm^{-1} são típicas de xilanas (YAO et al., 2017). Estas bandas, entretanto, estão presentes em todo material desta natureza independente do pré-tratamento.

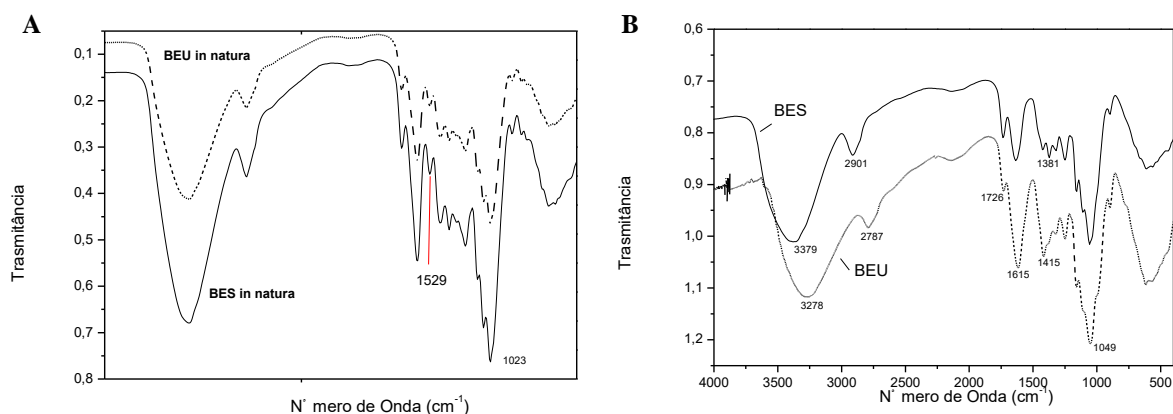


Figura 10. Espectroscopia na região do infravermelho do BES e BEU *in natura* (A) e após tratamento oxidativo com peróxido de hidrogênio (B) identificando as bandas dos materiais celulósicos e a eliminação das bandas de lignina, principal componente removido após a purificação

3.1.3. Análise Elementar – CHNO

A análise elementar foi realizada nos biogéis que passaram pela purificação com peróxido alcalino e seus representantes *in natura* (Tabela 9). A partir da análise destes dados,

pode-se observar que a diferença nos teores de carbono, hidrogênio e oxigênio nos biogéis purificados e *in natura* se dão devido ao processo de purificação e são pouco expressivas. Pode-se inferir, a partir desta observação, que o processo de extração não foi agressivo para as frações de açúcares da hemicelulose e na despolimerização da celulose. Isso também significa dizer que o biogel não é fortemente desconstruído, já que o mesmo é constituído por esses mesmos açúcares da hemicelulose.

Tabela 9. Análise Elementar dos Hidrogéis .

	C (%)	H (%)	N (%)
BEU 20/11, 5	36,75	6,06	0,21
BEU 7 /11, 5	36,76	6,12	0,43
BEU 7/10	37,49	6,12	0,28
BES 20/11, 5	41,11	6,31	0,29
BES 7/11, 5	40,28	6,2	0,28
BES 7/10	41,35	6,24	0,3
BES <i>in natura</i>	43,34	5,96	0,4
BEU <i>in natura</i>	41,63	5,57	1,83

3.1.4. Análises Térmicas - Análise Termogravimétrica (TG) e Análise Termogravimétrica diferencial (DTG)

As curvas das análises Termogravimétricas (TG) e Termogravimétrica Diferencial (DTG) dos biogéis *in natura* podem ser verificadas na Figura 11. Os termogramas obtidos são típicos de material lignocelulósico, onde se observa três principais zonas de perda de massa referentes a degradação de hemicelulose, celulose e lignina. Estudando sobre a estabilidade térmica da celulose em diferentes graus de cristalinidade, Kim, Eom e Wada (2010) corroboraram os resultados de outros autores quando concluíram que a despolimerização da hemicelulose ocorre entre 180 e 350 °C, a clivagem da ligação glicosídica da celulose entre 275 e 350 °C e a degradação da lignina entre 250 e 500 °C.

Nos termogramas dos biogéis *in natura* foram observadas quatro decomposições, sendo o primeiro decaimento verificado em 70-80 °C, aproximadamente, sendo atribuído a uma perda inicial de água. O segundo, em BES, ocorre em torno de 164 °C devido ao início da decomposição de hemicelulose. Em BEU *in natura*, essa decomposição é evidenciada em temperatura superior – 265°C – e corresponde a perda mais significativa em massa

(aproximadamente 80%). Esta diferença se dá pelo método de extração: enquanto em BES *in natura* toda biomassa é processada, em BEU *in natura* somente a fração do envoltório correspondente a formação do hidrogel é retirada, aumentando proporcionalmente a concentração de hemicelulose neste produto.

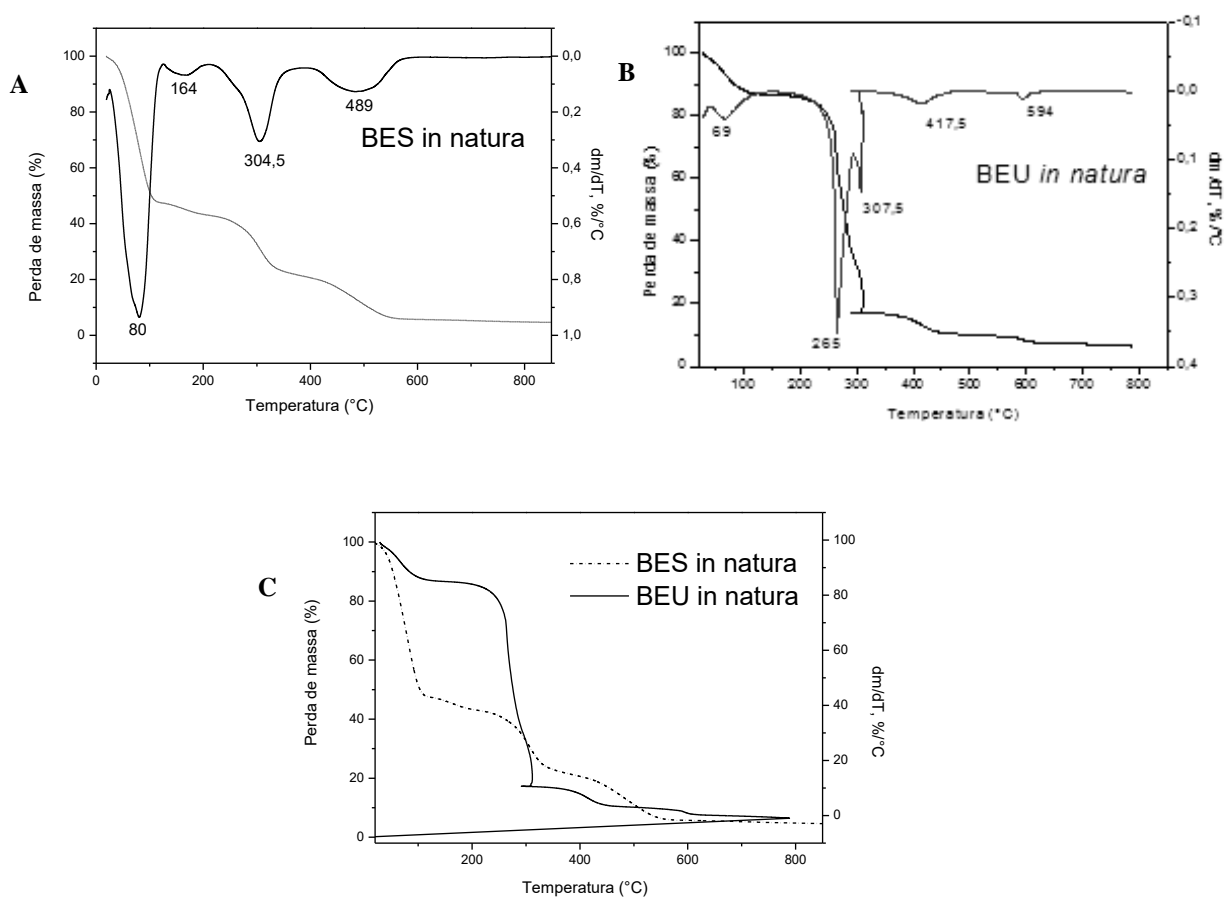


Figura 11. Termograma dos biogéis *in natura*: em A o biogel extraído por via úmida (BEU) e B extraído por via seca (BES). Em C pode ser observado a diferença entre os dois termogramas, evidenciando a maior estabilidade térmica de BES

A terceira zona de perda de massa é observada em torno nos 300°C e é devido a decomposição de celulose (CHOE et al., 2018). O último, atribuído a lignina, a qual se decompõe em torno de 420 - 450°C. Em BEU *in natura* a perda de massa é observada de forma discreta, correspondendo a menos de 5% em massa da fração lignocelulósica, o que já era esperado, pois, proporcionalmente, este biogel contém uma concentração menor de lignina devido a sua forma de extração. Uma maior estabilidade térmica pode ser, portanto, atribuída a BES *in natura* devido a presença de uma fração maior de lignina e outros compostos não orgânicos naturalmente presentes no material lignocelulósico, tal como as cinzas (OLIVEIRA

et al., 2017b). A lignina é composta de três tipos de unidades de benzeno propano, sendo reticuladas fortemente e com alta massa molar, assim, a estabilidade térmica da lignina é alta e requer uma temperatura inicial mais alta para a degradação térmica (KIM; EOM; WADA, 2010). O maior teor de lignina em BES *in natura* em relação às BEU *in natura* pode ainda explicar a menor porcentagem de cinzas em BEU *in natura* a partir de 490 °C, característica também observada por Oliveira e colaboradores (2017) ao analisarem fibras de celulose da casca de arroz e aveia

Características semelhantes são observadas na decomposição de BEU e BES após a purificação, sendo observadas somente as perdas de massa referentes a celulose e hemicelulose, já que a purificação oxidativa remove a fração de lignina presente no material. Entretanto, a decomposição de hemicelulose em BEU ocorre mais tardiamente em relação a BES, a uma temperatura mais elevada, sugerindo uma maior estabilidade térmica (Figura 12). Proporcionalmente, este material possui um teor de hemicelulose maior, sendo ainda essa faixa de temperatura a mesma da despolimerização e decomposição da celulose. Esta perda de massa, que corresponde a 50% do total, é, portanto, referente a estes dois componentes do biogel.

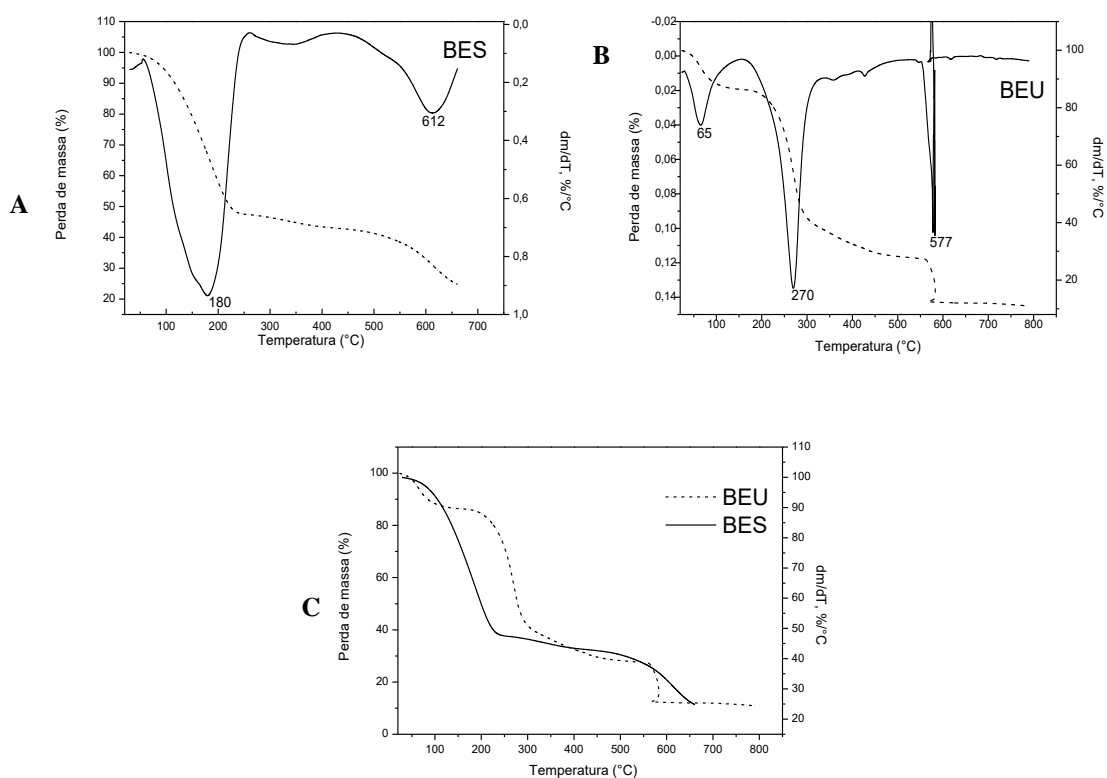


Figura 12. Termograma dos biogéis purificados: em A o biogel extraído por via úmida (BEU) e B extraído por via seca (BES). Em C pode ser observado a diferença de decomposição entre os dois termogramas

3.2. Caracterização Bioquímica dos biogéis purificados por via seca e úmida

3.2.1. Carboidratos Estruturais

3.2.1.1. Pectinas

O estudo para quantificação de pectina nos biogéis *in natura* foram negativos, indicando que os compostos formadores de gel não são compostos por esse carboidrato. A pectina é, em muitas espécies vegetais, responsável pela formação de gel e usada na indústria alimentícia na fabricação de geléia e como espessantes. Entretanto, na espécie *Magonia pubescens*, não é o carboidrato responsável pela formação do hidrogel natural presente no envoltório da sua semente.

3.2.2. Quantificação dos Teores de Glicose por teste enzimático

A eficiência da hidrólise dos biogéis é primeiramente avaliado a partir de observação visual dos frascos. Nos experimentos conduzidos com ácido sulfúrico a 2,5; 5,0 e 10% a quantidade de sólido não hidrolisado foi pequena, porém, apresentou coloração muito escura, indicando provável degradação dos produtos. Nos frascos com solução ácida mais diluída, entretanto, apresentava coloração mais amarelada, indicando conversão dos carboidratos estruturais em açúcares solúveis, mas uma quantidade maior de fração sólida. Esta parte da amostra não solubilizada pode conter açúcares não hidrolisados, tornando pouco representativa a quantificação de glicose nas amostras. Essa análise qualitativa pode ser comprovada posteriormente com a quantificação da glicose nos hidrolisados. A Figura 13 apresenta os frascos com o material hidrolisado.

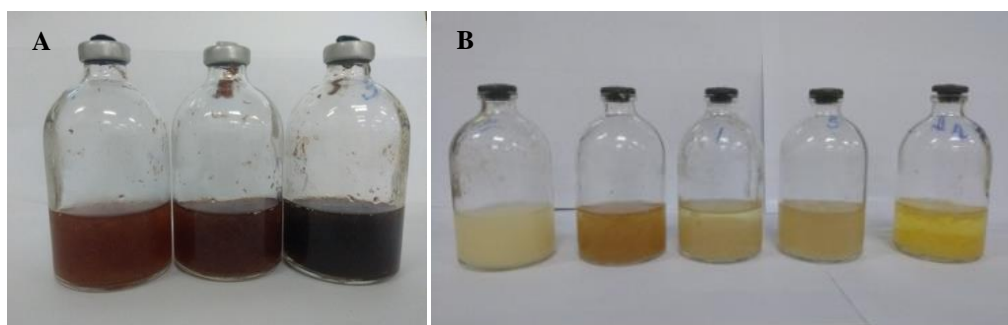


Figura 13. Hidrólise ácida dos materiais. Em A é representado as reações com 5, 10 e 1% de ácido sulfúrico, de cor escura, indicando degradação do material. Em B, os frascos com 0,5 e 1% de ácido sulfúrico, onde a cor amarelada representa uma solubilização dos açúcares. **Fonte:** o autor

Por se tratar de uma técnica rápida e simples, o teste enzimático de glicose pode ser utilizado para se ter uma idéia sobre a quantidade de açúcar produzido nas reações de hidrólise. O rendimento das reações de hidrólise foi calculado a partir da estequiometria da reação de glicose. Na Tabela 10, são demonstrados os teores de glicose e seu respectivo rendimento em relação a quantidade de celulose presente para cada produto analisado. A utilização de processos oxidativos, utilizando peróxido alcalino é descrita na literatura como um pré-tratamento da biomassa para obtenção de glicose/açúcares fermentáveis na geração de etanol de segunda geração (BOLADO-RODRÍGUEZ et al., 2016; MARTÍNEZ-PATIÑO et al., 2017c; SHIMIZU et al., 2018).

A baixa conversão de glicose pelos materiais por este método pode ser justificada pela dificuldade na etapa de hidrólise, onde altas concentrações de ácidos provocam a degradação do material e, em contrapartida, em concentrações baixas, a biomassa não é completamente digerida, deixando uma fração sólida no frasco de reação. Essa parte não solubilizada contém ainda muitos açúcares, incluindo glicose do polímero de celulose, que não foi contabilizada no teste enzimático.

Tabela 10. Quantificação dos teores de glicose dos biogéis

Biomassa	Extração	Massa (g)	Concentração ácido (%)	Tempo (min.)	Glicose (mg/dL)	Rendimento (%)
BES	<i>in natura</i>	0,5025	0,5	60	38,84	13,28
BES	<i>in natura</i>	0,5019	0,5	120	3,61	1,23
BEU	<i>in natura</i>	0,5021	0,5	60	48,32	25,62
BEU	<i>in natura</i>	0,5011	0,5	120	0,28	0,15
BES	peróxido	0,5012	0,5	60	35,87	4,67
BES	peróxido	0,5012	0,5	120	2,70	0,35
BEU	peróxido	0,5045	0,5	60	44,77	27,81
BEU	peróxido	0,5013	0,5	120	4,24	2,63
BES	<i>in natura</i>	0,5063	1,0	60	6,64	2,27
BES	<i>in natura</i>	0,5027	1,0	120	18,53	6,34
BEU	<i>in natura</i>	0,5039	1,0	60	8,39	4,45
BEU	<i>in natura</i>	0,5019	1,0	120	19,23	10,19
BES	peróxido	0,5018	1,0	60	6,99	0,91
BES	peróxido	0,5038	1,0	120	16,43	2,14
BEU	peróxido	0,5031	1,0	60	17,13	10,64
BEU	peróxido	0,5030	1,0	120	18,18	11,29

Entretanto, observando os dois tempos de reação e as concentrações de 0,5 e 1,0% é possível notar que o tempo de reação e a concentração mais elevada exerceu um efeito negativo na conversão de glicose. Ainda entre BES e BEU, os maiores rendimentos obtidos foram do material extraído por via úmida. Por se tratar de uma fração celulósica menor, esta pode estar mais suscetível ao ataque ácido e, conseqüentemente, mais facilmente hidrolisável.

3.2.2.1. Açúcares por Cromatografia Líquida - HPLC

O Tingui (*Magonia pubescens*) é uma espécie nativa do bioma Cerrado pertencente à família das *sapindaceae* cuja floração ocorre entre os meses de julho a setembro e frutificação de agosto a novembro. Os frutos produzidos são de cor marrom, lenhosos, deiscentes² e as sementes são aladas. (GUARIM NETO, GERMANO ; SANTANA, 2000; MACEDO et al., 2009b; SILVA JUNIOR, 2006). Por serem típicos de clima seco com longos períodos de estiagem, necessitam desta mucilagem como forma de preservação da espécie, funcionando como um reservatório de água que promove a aderência da semente ao solo, além de regular a germinação.(FAHN, 1990; JOLY et al., 1980; SALGADO-LABOURIAU, 1973)

Esse hidrogel é produzido na segunda camada mais externas do envoltório da semente, sendo composta apenas de carboidratos que são: glicose, xilose, manose, rafinose, arabinose e galactose. Eles diferem entre as camadas em relação a proporção de ligações glicosídicas (GORIN et al., 1996; RIBAS DE OLIVEIRA; ALQUINI; GORIN, 2001).

A quantificação dos açúcares foi realizada a partir dos estudos de Oliveira (2001) e Gorin (1996) pela realização de reações de hidrólise ácida, diferenciando os hidrogéis pela forma de extração: via seca e úmida e suas respectivas formas purificadas. Os açúcares pesquisados foram Arabinose, Galactose, Raminose, Glicose, Xilose e Manose. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 11.

Para todos os biogéis, o maior índice obtido foi para a glicose, seguido de xilose, manose e galactose. Apesar da forma de extração ter sido diferente, os resultados se assemelham

² Frutos se abrem quando maduros expondo as sementes

aos obtidos por meio de CP-MAS ^{13}C NMR nos estudos realizados por Gorin e colaboradores (1996).

Tabela 11. Quantificação de açúcares das amostras de Biogel obtido por via seca e úmida e suas respectivas purificações

Amostra	Arabinose mg/dL	Galactose mg/dL	Ramnose mg/dL	Glicose mg/dL	Xilose mg/dL	Manose mg/dL
BES	0,460	4,817	n.a	167,180	90,200	3,257
BES <i>in nat</i>	1,057	10,253	5,453	128,833	54,567	3,770
BEU	0,253	6,130	2,447	136,123	104,287	3,200
BEU <i>in nat</i>	0,897	11,513	6,520	107,863	78,610	3,177

A predominância de glicose pode vir também pela despolimerização de celulose durante a hidrólise ácida. De acordo com a estequiometria da reação, 324,0 g de celulose produzem 360,0 g de glicose. Deste modo, se o rendimento for considerado máximo, ou seja, 100%, 500 mg de celulose produz 555,6 mg de glicose. Portanto, a concentração máxima de glicose produzida seria de 1389 mg.dL^{-1} (GROSSI, 2015). Para a reação com BEU, considerando o teor de celulose de 11,6%, 0,5 g de BEU contém 0,0058 g de celulose. Esta quantidade de celulose produz 64,4 mg de glicose. Considerando o rendimento da reação de 100%, a concentração máxima de glicose produzida seria de 161 mg.dL^{-1} .

Cálculo semelhante foi realizado para BES, cujo teor de celulose é de 54,23%, resultando num quantitativo de celulose de 0,2711 g em 0,5g de amostra de BES. Para esta quantidade de celulose pode-se produzir 301,3 mg de glicose. Na condição de rendimento da reação de 100%, a concentração máxima de glicose produzida para BES seria equivalente a $753,25 \text{ mg.dL}^{-1}$.

3.2.3. Análises Texturais – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises morfológicas em Microscópio Eletrônico de Varredura dos biogéis *in natura* demonstram a superfície característica de materiais lignocelulósicos. Na Figura 14A é possível observar o aspecto folhoso ou lamelar de BES, com formação em camadas e estruturas de canais. Em BEU (Figura 14B), por possuir uma quantidade de celulose, lignina e outros extrativos em menor proporção, é observado uma superfície mais regular e fibrosa,

característica que pode ser atribuída ao hidrogel formado nas camadas externas do envoltório de Tingui.

Após o tratamento de BES, é observado que os pacotes de fibra do envoltório se reorganizam em camadas homogêneas. Esta diferenciação indica que, sob as fortes condições de tratamento químico oxidativo, quase todos os componentes que ligam a estrutura de fibrila do envoltório da semente de Tingui foram removidos, permitindo as fibras para separar em uma forma individual. Este comportamento foi também observado por Johare colaboradores (2011) na extração alcalina de celulose de cascas de arroz. Segundo estes autores, o tratamento em pH alcalino deve eventualmente reduzir o tamanho das fibras do micron à escala nanométrica.

As diferenças na superfície de BEU são menos significativas após o tratamento oxidativo. Como já mencionado anteriormente, este é um material que demandou menos peróxido por ser mais "puro" em relação a BES. Os dados da microscopia corroboram, portanto, com as análises química ao demonstrar que o método de extração do hidrogel do envoltório da semente de *Magonia* por via úmida gera um produto mais homogêneo.

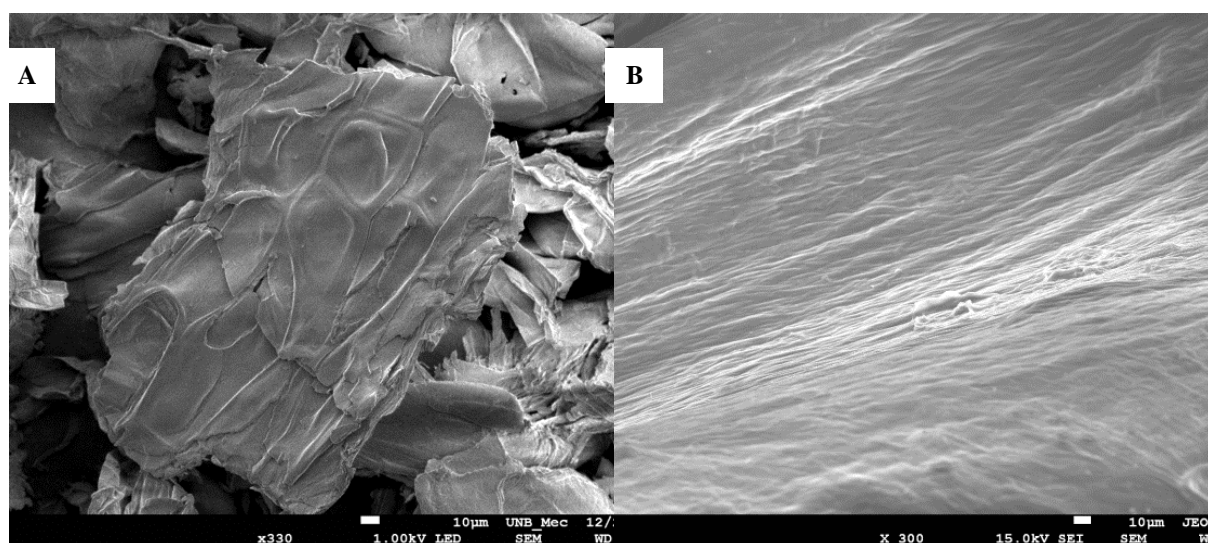


Figura 14. Micrografia Eletrônica de Varredura de BEU (A) e BES (B) *in natura* demonstrando a característica fibrosa do material lignocelulósico. **Fonte:** o autor

Em ambos os produtos pode ainda ser observado a incidência de poros e cavidades que não são observados no material *in natura* (Figura 15). Estas estruturas já foram anteriormente reportada em trabalhos anteriores (VIEIRA, 2015) e são atribuídas ao método de secagem a baixas temperaturas e pressão.

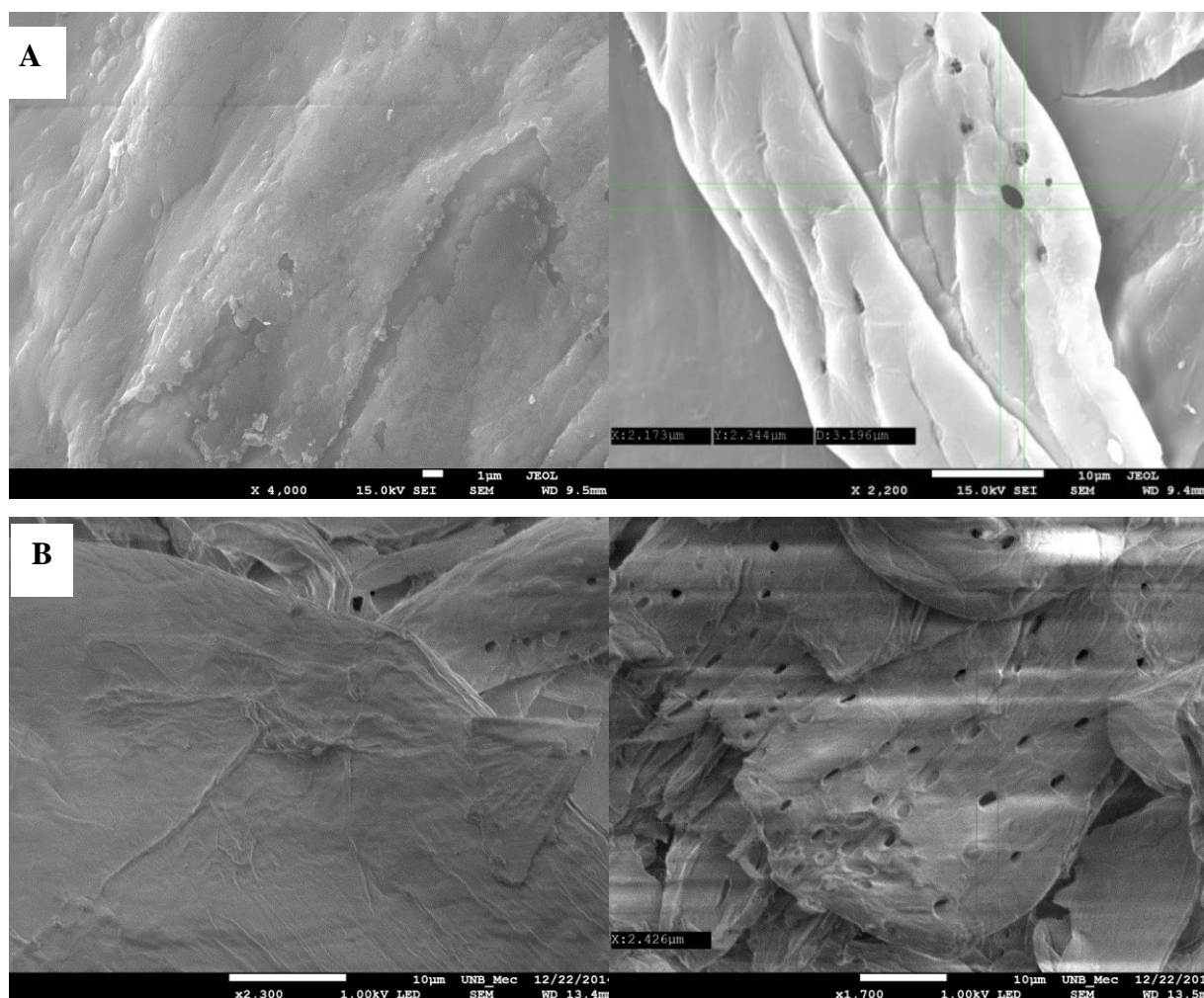


Figura 15. Micrografia Eletrônica de Varredura de BEU (A) e BES (B) evidenciando a formação de poros e cavidades após a purificação e secagem a baixas temperaturas e pressão. **Fonte:** o autor

4 Conclusões

Duas formas de extração do hidrogel do envoltório da semente de *Magonia pubescens* foram testadas: a primeira, já executada em trabalhos anteriores, prioriza toda a biomassa do envoltório a partir da sua moagem, sendo aqui chamada de extração por via seca. A segunda forma de extração, nomeada de extração por via úmida, conseguiu extrair de forma mais seletiva a fração responsável pela formação do hidrogel a partir de seu intumescimento prévio. Este método gerou um hidrogel *in natura* com menores teores de lignina, celulose, extrativos e outros compostos não formadores de gel, sendo, portanto, um material de mais fácil purificação.

A partir dos estudos de purificação, foi possível obter uma concentração ótima de peróxido em pH adequado para a obtenção dos biogéis: para o biogel extraído por via úmida

(BEU), esta concentração foi de 7% e para o biogel extraído por via seca (BES), 20% ambos em pH 10. Esta diferença mais uma vez é justificada pela composição inicial dos biogéis.

Dentre as características do biogéis, a mais importante é a capacidade de absorção de água. No biogel extraído por via úmida, este índice foi potencialmente elevado por ser um método mais seletivo, sendo capaz de absorver mais de 150 vezes seu próprio peso. As formas de purificação também foram cuidadosamente avaliadas de modo que prejudicassem o mínimo possível esta característica, tendo em vista que a absorção de água de BEU *in natura* é de 161 g/g e de BEU de 152 g/g.

Outra vantagem de muito interesse na modificação da forma de purificação dos hidrogéis é a eliminação dos teores de cloro residual, provenientes do clorito de sódio anteriormente utilizado. O cloro, um oxidante forte, quando em contato com a pele pode causar prejuízos ao usuário, tais como irritação e desenvolvimento de reações alérgicas, sendo um impeditivo ao seu uso em determinadas aplicações do biogel.

Os hidrogéis foram, portanto, otimizados de forma que suas características de absorção de água fossem potencializadas e os riscos de utilização em produtos de uso em saúde e cosmética eliminados, se tornando um produto mais seguro e com características físico-químicas interessantes ao mercado, já que se trata de um produto natural.

Os biogéis tiveram caracterizados seus teores de carboidratos formadores de gel, sendo os constituintes principais a glicose e xilose, seguidos de manose e galactose. Esta constituição é muito importante quando se pensa na aplicação dos biogéis principalmente para uso médico e farmacêutico, pois o produto deve ser o mais puro e livre de matéria-prima que possa causar reações alérgicas, intoxicação ou qualquer outra interação deletéria ao tratamento que o paciente será submetido.

A utilização do biogel natural de *Magonia pubescens* St. Hil pode representar uma grande vantagem frente aos demais pois, além de ser uma inovação tecnológica na produção de hidrogéis naturais, pode ainda impulsionar a economia local pela extração das sementes, configurando, portanto, o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis que devem ser aplicadas nos mais variados ramos da indústria, como por exemplo a agroindústria, farmacêutica, médica e cosmética.

CAPÍTULO 2

MODIFICAÇÃO QUÍMICA DOS HIDROGÉIS PURIFICADOS

1 Introdução

Os hidrogéis são uma classe de biomateriais que tem se destacado pela sua grande versatilidade, sendo atualmente aplicados principalmente na área médica devido a sua alta capacidade de absorver água e fluidos biológicos. Por este motivo, várias rotas de obtenção destes materiais são largamente exploradas na literatura. Sendo o hidrogel uma rede polimérica hidrofílica e reticulada de forma a produzir uma estrutura elástica, qualquer técnica usada para criar um polímero reticulado pode ser utilizada para produzir um hidrogel (GYLES et al., 2017).

A alta hidrofilicidade dos hidrogéis está intimamente ligada aos grupamentos presentes em suas cadeias como por exemplo -OH, -NH₂, -COOH, -CONH₂, -SO₃H; e a insolubilidade se justifica devido as reticulações (ligações covalentes) ou interações físicas das cadeias poliméricas (AHMED, 2015; AOUADA; MATTOSO, 2009; BAJPAI et al., 2016; SHARMA et al., 2014). Na prática, para atingir elevados graus de intumescimento, é comum a utilização de polímeros sintéticos que sejam solúveis em água quando na forma não-reticulada (AHMED, 2015).

Por ser uma classe de materiais que pode ser obtido a partir de diferentes rotas químicas e fontes de matérias-primas, os hidrogéis possuem várias classificações. As principais são sucintamente descritas a seguir:

1.1. Classificação dos Hidrogéis

Devido às suas variações de composição, os hidrogéis são classificados principalmente em três tipos para aplicações biomédicas, com base nas propriedades físicas: hidrogéis sólidos, semi-sólidos e líquidos.

Os hidrogéis sólidos podem imitar as propriedades físicas, químicas, elétricas e biológicas da maioria dos tecidos biológicos, mimetizando a arquitetura complexa do tecido e fornecendo um ambiente celular muito semelhante ao real. este tipo de hidrogel tem estrutura fortemente reticulada com agentes de reticulação iônicos ou covalentes e são sólidos na natureza à temperatura ambiente, intumescendo em água, soluções tampão e fluidos biológicos.

Hidrogéis semisólidos, também chamados hidrogéis bio-adesivos ou mucos-adesivos, têm fortes interações adesivas com tecidos moles através de forças intermoleculares (van der Waals, ligações de hidrogênio). Esta característica é muito útil para dosagem prolongada de fármacos administrados por vias bucais, oculares, retais, vaginais, nasais e sublinguais. Estes tipos de hidrogéis são usualmente preparados com dois tipos de materiais, dos quais, pelo menos um deve possuir natureza biológica, alta massa molar, o que melhora a natureza adesiva com umedecimento, absorção e desabsorção, grau de reticulação e a flexibilidade dos hidrogéis (VARAPRASAD et al., 2017).

Outra classificação destes materiais tem como base sua composição polimérica e são nomeados homopolimérico, copolimérico ou multipolimérico. Os hidrogéis homopoliméricos são originários de um único tipo de monômero na rede polimérica. Neste tipo de hidrogel, o monômero e a técnica de polimerização envolvida em sua síntese geralmente determina se a estrutura do hidrogel será reticulada.

Os hidrogéis copoliméricos são compostos por duas ou mais classes distintas de monômeros onde pelo menos um possui propriedades hidrofílicas. Este tipo de configuração de polímero tem uma cadeia que é disposta aleatoriamente em blocos ou arranjos irregulares no esqueleto da rede polimérica (GYLES et al., 2017).

Redes multipoliméricas, também conhecidas como redes híbridas, incluem Redes Interpenetrantes (IPNs) e Semi-Interpenetrantes (Semi-IPNS), que envolvem a polimerização de dois ou mais polímeros, geralmente colocando o hidrogel pré-polimerizado na solução de monômeros da rede polimérica. A reação pode ocorrer na presença de um agente de reticulação de modo a formar um IPN completo ou na ausência do iniciador de reticulação para formar um Semi-IPN.

Os IPNs são convencionalmente definidos como a combinação íntima de dois polímeros, dos quais pelo menos um é sintetizado ou reticulado na presença imediata do outro. Já os semi-IPNs podem preservar eficientemente as rápidas taxas de resposta cinética ao pH ou temperatura, devido à ausência de uma rede elástica de interpenetração restritiva, enquanto ainda fornece benefícios como tamanho de poro modificado e liberação lenta do medicamentos (ULLAH et al., 2015).

IPNS foram desenvolvidos devido a limitações, incluindo o potencial de absorção, e resistência mecânica, que foram observados em alguns hidrogéis homopoliméricos. Ao combinar várias classes de polímeros com características particularmente desejáveis, os cientistas conseguiram reduzir algumas dessas limitações. Numerosas vantagens de IPNs foram descobertas, algumas das quais incluíram: matrizes de hidrogel relativamente densas, propriedades físicas e mecânicas melhor controladas, e um potencial mais eficiente de carregamento de drogas, entre outros (GYLES et al., 2017).

Os hidrogéis podem ainda ser classificados segundo o tipo de entrecruzamento de suas cadeias em químicos e físicos. Em géis físicos, as cadeias poliméricas são mantidas lado a lado através do emaranhamento das mesmas ou por meio de ligações não covalentes, como forças de atração induzidas por ligações de hidrogênio, interações iônicas ou forças hidrofóbicas. A seleção exata do hidrocolóide, concentração e pH podem levar à formação de uma grande variedade de géis físicos e é uma área que tem atraído muita atenção, especialmente na indústria alimentícia (MAHINROOSTA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2017b). Entretanto, os hidrogéis sintetizados através de reticulação física tendem a ser mais frágeis e geralmente são sistemas reversíveis

Em géis químicos, cadeias poliméricas são conectadas umas às outras através de ligações covalentes. Os principais métodos químicos para a síntese de hidrogéis incluem grafitação ou aplicação de um reticulador para interconectar duas cadeias poliméricas. A reticulação química envolve a formação de ligações covalentes entre cadeias poliméricas durante a polimerização de monômeros com baixo peso molecular ou reticulação de precursores poliméricos. Os métodos mais amplamente utilizados para a obtenção de hidrogéis quimicamente reticulados são o emprego de reações heterogêneas de polimerização na presença de reticuladores bifuncionais ou multifuncionais. A reticulação de polímeros naturais e sintéticos pode ser obtida pela reação de alguns grupos funcionais, tais como grupos hidroxilas, carboxílicos e amina com agentes de reticulação como aldeídos (MAHINROOSTA et al., 2018).

1.2. Reticulação Química

Técnicas de polimerização radicalares permitem a preparação de hidrogéis com diferentes composições, tamanhos e morfologias. O uso de iniciadores atrelados às reações de reticulação, permite a incorporação de grupos funcionais no interior ou na superfície dos

hidrogéis criando estruturas tridimensionais características dessa classe de materiais (MAHINROOSTA et al., 2018).

Uma diversidade de técnicas de reticulação compreendendo reações de base de Schiff, química *click*, reticulação de amida, troca de dissulfeto de tiol, reticulação fotoinduzida, reticulação mediada por enzima e etc., tem sido usada para a fabricação de hidrogéis. Outra técnica empregada são a obtenção dos hidrogéis *in situ*, fluidos injetáveis pouco invasivos, que foram submetidos a uma gelificação para tomar qualquer forma em um local específico após administrado no corpo, respondendo a ligações cruzadas iônicas (QI et al., 2016).

Géis quimicamente reticulados podem também ser obtidos a partir de monômeros de baixo peso molecular na presença de um agente de reticulação por polimerização radicalar. Este é um dos métodos mais utilizados para a preparação de hidrogéis, pois é um sistema muito eficiente que resulta na rápida formação do gel, mesmo sob condições moderadas. Exemplo para este sistema é a fabricação de hidrogel a partir de iniciadores via radical livre persulfato de amônio (APS) ou persulfato de potássio (KPS) (VARAPRASAD et al., 2017)

Contudo, o objetivo deste capítulo é realizar a modificação química nos biogéis extraídos do envoltório da semente de *Magonia pubescens* através da incorporação do agente de reticulação N',N-metilenobisacrilamida e avaliar, através de medidas gravimétricas de capacidade de absorção de água seus efeitos. A caracterização físico-química também será considerada nesta avaliação, comprovando a entrada do agente reticulante na matriz do hidrogel e seus efeitos no comportamento térmico e características morfológicas.

2 Material e Métodos

2.1. Modificação dos Hidrogéis Purificados com N'-N-metilenobisacrilamida

Os biogéis extraídos por via úmida (BEU) e seca (BES) de *Magonia Pubescens* foram quimicamente modificados através do agente de reticulação N'-N-metilenobisacrilamida (MBAAm) na concentração de 30% em relação a massa seca de biogel em solução aquosa. Foi utilizado ainda catalisador N,N,N',N' – tetrametil-etilenodiamina (TEMED) e Persulfato de Potássio (K₂S₂O₈) como inicializador da reação de polimerização via radical livre nas concentrações de 0,1 e 0,4 mL/g, respectivamente, de acordo com metodologia descrita por Vieira (2015). Após as modificações, os biogéis foram nomeados BMEU e BMES.

2.2. Caracterização dos Biogéis Modificados

2.2.1. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho- FTIR

A Espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi realizada nos biogéis modificados a fim de se verificar a efetividade da incorporação do agente de reticulação na matriz polimérica após as modificações químicas realizadas. A técnica foi executada conforme anteriormente descrita no capítulo 1.

2.2.2. Análises Térmicas

2.2.2.1. Análise Termogravimétrica (TG) e Análise Termogravimétrica Diferencial (DTG)

As análises térmicas foram realizadas nos BMEU e BMES com o objetivo de se verificar as mudanças na estabilidade térmica dos materiais após a modificação. As curvas de TG/DTG foram obtidas em um analisador simultâneo modelo SDT-2960 da TA Instruments de acordo com metodologia descrita no capítulo 1.

2.2.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Calorimetria Exploratória diferencial pode ser utilizada para a investigação da Termoresponsividade dos biogéis, ou seja, transição de fase dependente da temperatura. Este fenômeno ocorre quando um dos componentes do hidrogel é insolúvel no meio, abaixo ou acima da chamada temperatura crítica (em Inglês Lower Critical Solution Temperature – LCST e Upper Critical Solution Temperature – UCST).

Abaixo da LCST, as ligações de Hidrogênio realizada pelos grupos OH da celulose e hemicelulose com a água são predominantes, favorecendo a solubilidade do polímero no meio. Em contrapartida, acima da LCST, as ligações de Hidrogênio se enfraquecem e o HPM se desidrata compactando a cadeia polimérica (BAJPAI et al., 2008). Este efeito pode ainda ser interessante para os sistemas de entrega de fármacos onde a substância a ser ingerida é adicionada à matriz do hidrogel em temperaturas abaixo da LCST e, ao ser ingerido, sua temperatura entra em equilíbrio com a temperatura corpórea (maior que a LCST) fazendo com que o hidrogel sofra retração e libere água juntamente com o medicamento (BAJPAI et al., 2008; GONZALEZ, 2008).

Para realização deste ensaio, os biogéis foram liofilizados. As análises de DSC foram conduzidas utilizando o equipamento DSC-60 da SHIMADZU. Para a realização dos ensaios, as amostras são pesadas e hermeticamente fechadas em painéis de alumínio, utilizando para cada amostra 2,0 a 5,0mg de material. As análises foram realizadas a uma taxa de aquecimento de 5 °C/min. até atingir a temperatura máxima de 150 °C sob fluxo de He a 30 mL/minuto. A temperatura de início do pico endotérmico de DSC é considerada como LCST (Egbu et al., 2018).

2.2.3. Raios-X e Cristalinidade

Os difratogramas de raios-X são obtidos utilizando-se variação angular (2θ) de 5° a 40° com taxa de 2°/min., empregando radiação $K\alpha$ de Cu-K ($\lambda=1,5418\text{\AA}$). A cristalinidade é então determinada de acordo com o sugerido por Segal et al (1959). O método, empírico, determina a celulose cristalina por intermédio das medidas das intensidades I002 da reflexão (002), (2θ entre 22 e 23°) e a celulose amorfa Iam medida em $2\theta = 18^\circ$. A partir destes dados foi definido um índice de cristalinidade K conforme equação 7.

$$K = \frac{I(\sim 22/23^\circ) - I(18^\circ)}{I(\sim 22/23^\circ)} \times 100 \quad (7)$$

2.2.4. Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X - EDX

As amostras foram submetidas ao procedimento de secagem em liofilização para posterior metalização em ouro, procedimento obrigatoriamente necessário à microscopia eletrônica de varredura. A identificação e quantificação dos metais com maior incidência na superfície dos biogéis foi realizada nos materiais *in natura* e após a purificação com peróxido e reticulação química. As análises foram realizadas em Espectrômetro de fluorescência de raios-X por Energia Dispersiva acoplado em microscópio eletrônico de varredura modelo JSM-7001F da Jeol no laboratório de Microscopia do Instituto de Biologia, UnB.

2.2.5. Grau de Intumescimento

A Capacidade de absorção de água é medida pelo grau de intumescimento, de acordo com metodologia descrita no capítulo 1 item 2.6.7. Foram realizadas medidas em BMES e BMEU assim como em BEU e BES a fim de comparar a evolução após a modificação química.

2.2.6. Análises Texturais - Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises morfológicas dos biogéis modificados foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura modelo JSM-7001F da Jeol no laboratório de Microscopia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, de acordo com metodologia descrita no capítulo 1.

2.2.7. Caracterização Mecânica - Viscosidade

Para a realização destes ensaios, os biogéis foram intumescidos ao máximo. A viscosidade foi determinada em viscosímetro rotacional Brookfields em faixas de temperatura diferentes, variando de 5 °C até 42 °C e utilizando spin S64 e S63 para as medidas dos géis.

3 Resultados e Discussão

3.1. Verificação da Incorporação do Agente Reticulante

3.1.1. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho- FTIR

A análise de FTIR foi realizada tanto nos Biogéis Extraídos por via Seca e Umida (BES e BEU) como nos Biogéis Modificados e Extraídos por via Seca e Umida (BMES e BMEU), para verificar se novas ligações químicas foram formadas. A partir de uma análise desses espectros (Figura 16), é possível constatar o surgimento de algumas bandas de absorção que são atribuídas a funções nitrogenadas existentes na estrutura do agente de reticulação N'-N-metilenobisacrilamida, entre 3267– 3306 cm^{-1} , que é característica de amidas secundárias, assim como em 1539 cm^{-1} representa uma deformação angular no plano do grupamento NH (KOUSER et al., 2018; SHARMA et al., 2017).

Estas bandas características da incorporação do agente reticulante à matriz dos biogéis, é observada igualmente nos dois espectros (Figura 16 A), podendo concluir que as modificações foram efetivas tanto no BMES quanto no BMEU, o que se pode inferir que a forma de extração do gel da biomassa não interfere na modificação química, uma vez que grupos funcionais continuam disponíveis e em grande quantidade no biogel purificado.

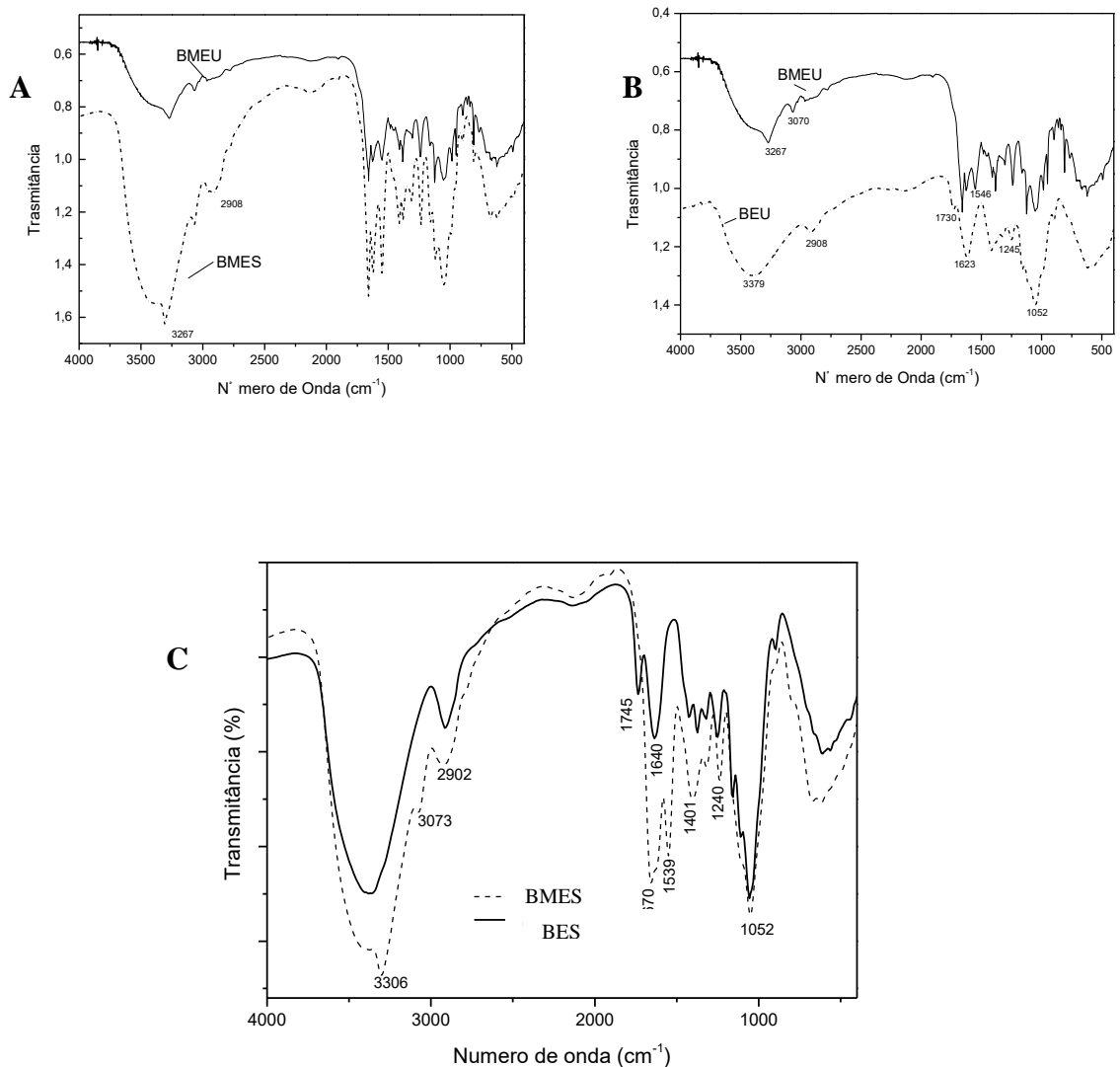


Figura 16. Espectroscopia da região do infravermelho dos Biogéis modificados (A), purificados e modificados por via úmida (B) e purificados e modificados por via seca (C) evidenciando a modificação química com MBAAM;

Apesar de uma possível esterificação dos grupamentos hidroxila, não foi observada uma redução na intensidade da banda OH ocorridas em 3375 cm^{-1} , pois o produto é uma mistura de vários carboidratos ricos em hidroxilas, que não foram acessíveis à modificação. Comparativamente, algumas bandas sofrem deslocamento ou interposição em relação aos biogéis não modificados, como é o caso da banda em 1640 cm^{-1} que corresponde tanto ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ das amidas quanto de água residual absorvida pela amostra (BAPTISTA; BORGES; FERREIRA, 2010; SHARMA et al., 2014). Em BMES é possível observar claramente a interposição, onde esta banda específica fica bem pronunciada. Estes fenômenos podem ainda ser atribuídos às fortes interações ocorridas entre os grupos hidroxílicos (OH) dos

açúcares presentes na biomassa e os grupos -NH e do polímero formado pelo MBAAm (KOUSER et al., 2018), já que na reticulação química, o agente de reticulação pode sofrer polimerização.

3.2. Análises Térmicas

3.2.1. Análise Termogravimétrica (TG) e análise Termogravimétrica Diferencial (DTG)

As curvas das análises Termogravimétricas (TG) e Termogravimétrica Diferencial (DTG) dos BMEU e BMES podem ser vistas nas Figuras 17. Todos os sistemas mostram uma perda de massa inicial associada à evaporação da “água residual” em temperaturas que variam de 65 °C a 120 °C, e uma perda de massa mais pronunciada com flexões múltiplas a temperaturas mais altas (160 - 495 °C), devido à degradação térmica dos vários componentes. A DTG ainda indica que pode haver outra perda de água na faixa de 128 a 135 °C, o que pode representar água quimicamente ligada aos grupos funcionais da matriz polimérica por ligações de hidrogênio ou outras interações intermoleculares, enquanto a água livre, que está apenas absorvida na matriz polimérica, é liberada mais rapidamente.

De modo geral, podem ser visualizadas as quatro zonas de perda de massa já relacionadas para os biogéis purificados. O início da perda de hemicelulose pode ainda ser observado em alguns termogramas a partir de 135 e 160 °C para BMES e BMEU, respectivamente, ficando ainda mais pronunciado em torno de 300 °C onde começa a ocorrer também a decomposição de celulose. A alta estabilidade térmica das holoceluloses (celulose e hemicelulose) podem ainda ser atribuída à sua característica supramolecular “hiper-emaranhada”, que é responsável por sua rigidez relativamente alta e alta densidade de empacotamento local no estado sólido (AJOVALASIT et al., 2018).

Teoricamente, o aumento da reticulação na matriz polimérica exerce um efeito positivo na estabilidade térmica, fazendo com que a celulose e hemicelulose, agora modificada quimicamente, que compõe o material se decomponham a uma temperatura superior (AZEREDO; WALDRON, 2016). Este efeito é possivelmente causado pela ligação do agente reticulante com a cadeia polimérica, formando estruturas mais termoresistentes, onde as moléculas estão mais arranjadas e, conseqüentemente, menos suscetíveis, resultando numa decomposição a temperaturas mais elevadas. O alto grau de reticulação contribui para o

aperfeiçoamento das características estruturais de materiais poliméricos, no entanto é esperado ainda que estes materiais tenham uma capacidade de absorção reduzida devido ao efeito de enrijecimento das cadeias poliméricas, não permitindo que o biogel se expanda completamente.

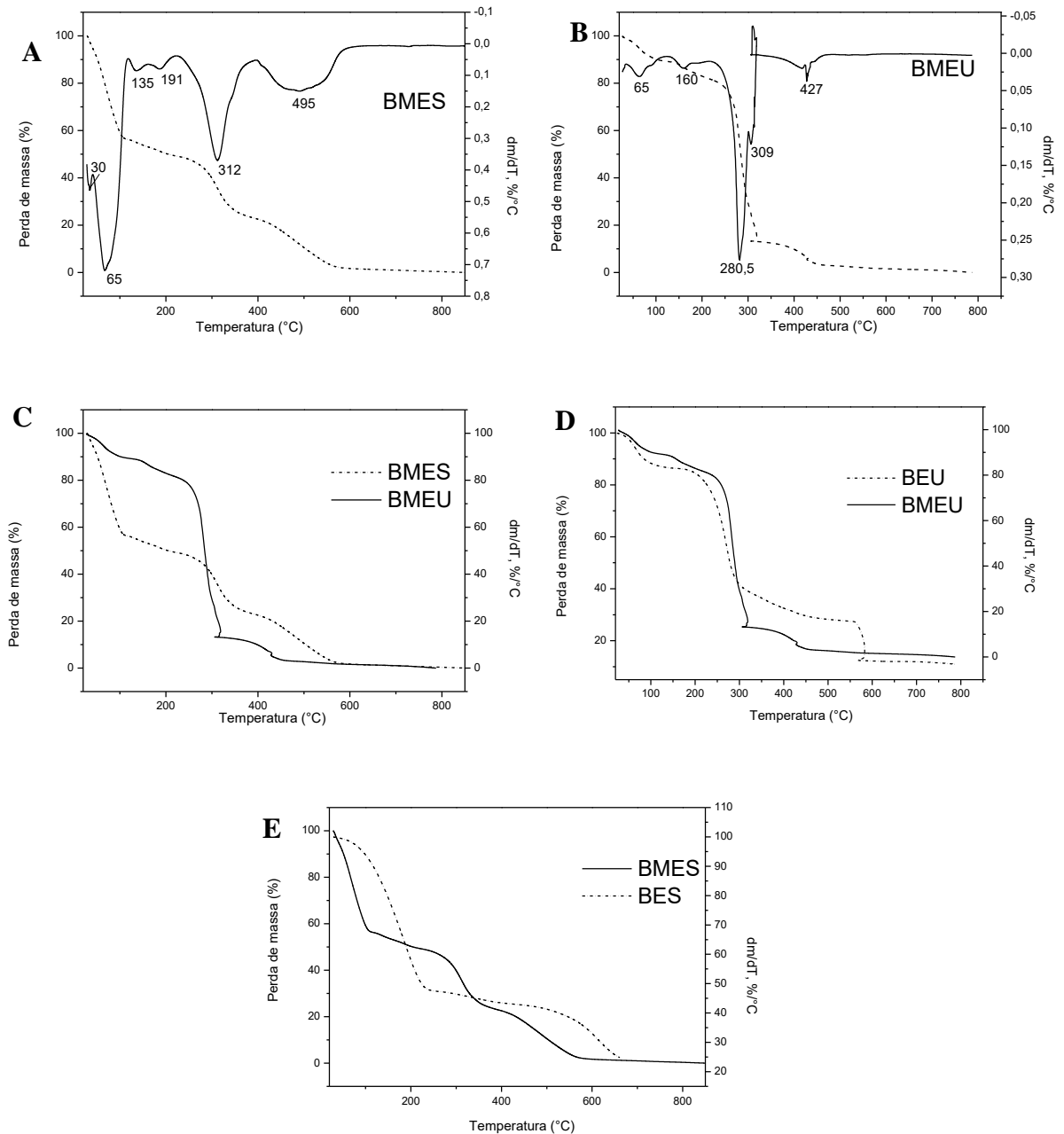


Figura 17. Curvas de TG e DTG do biogel purificado e reticulado: em A e B, curvas típicas de materiais celulósicos e em C, D e E demonstrando as diferenças de estabilidade térmica causadas pela reticulação química

Este fenômeno, no entanto, só foi observado para BMES onde, antes da reticulação química, cerca de 50% de sua massa foi perdida em temperatura próxima de 200 °C e, após, a mesma porcentagem resistiu até temperatura próxima de 380 °C, indicando que a fração de

hemicelulose e celulose amorfa que se decompõe nessa faixa de temperatura se tornaram mais resistente a decomposição térmica devido as novas ligações realizadas com o agente reticulante. Para BMEU, a porcentagem de perda de massa é praticamente igual na região de 300 °C, representando 49% para antes da modificação em BEU e 52% para BMEU. A diferença maior para o produto após a modificação pode ser atribuída a MBAAm, cuja decomposição é relatada em torno dessa temperatura.

Comparativamente, BMES é um material mais termicamente estável que BMEU devido as suas características naturais já anteriormente mencionadas, como teor mais alto de celulose, que se decompõe a temperaturas mais elevadas que as hemiceluloses. Esta, por sua vez, são a composição principal de BMEU, justificando sua decomposição em temperaturas mais brandas.

Ocorre ainda, em BMEU, um comportamento diferenciado que pode ser reportado ao rearranjo ou a decomposição da celulose cristalina, onde é registrada uma considerável perda de calor em torno de 300 - 310 °C. Esta mudança de fase pode ser tão brusca que requer uma quantidade de energia muito grande, sendo observada na DTG como um resfriamento do sistema. Este fenômeno pode ser melhor visualizado nos termogramas dos biogéis purificados pelo aumento da proporção de celulose, já que as frações de lignina e outros compostos orgânicos, como extrativos por exemplo, foram removidos pelos tratamentos oxidativos.

O aumento no teor de cinzas foi mais significativo somente em BMES, passando de 5,2% para 10,2%, sendo esse aumento justificado pela incorporação do agente de reticulação à matriz polimérica do hidrogel. Em BMEU esse teor foi praticamente inalterado em comparação ao biogel purificado e não modificado (BEU).

3.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC foram realizadas com os biogéis purificados extraídos por via seca e úmida e seus respectivos produtos da modificação química com MBAAm. Como pode ser observado na Figura 18, houve mudança significativa com característica endotérmica em BES a partir de 30 °C se acentuando a aproximadamente 40 °C. Comportamento semelhante é repetido em seu produto da modificação química, BMES. Para BEU e BMEU esta tendência também é observada, contudo, os picos endotérmicos estão deslocados, apresentando ponto máximo em 60 °C.

Segundo Egbu e colaboradores (2018), a temperatura de início do pico endotérmico de DSC é considerada como LCST (*Lower Critical Solution Temperature*). Neste ponto, a cadeia polimérica retrai-se do solvente circundante de maneira repulsiva, ocorrendo expulsão do conteúdo de água. O mesmo autor atribui o pequeno aumento na LCST por materiais semelhantes a BEU pela natureza hidrofílica dos mesmos, justificando seu pico endotérmico deslocado (EGBU et al., 2018).

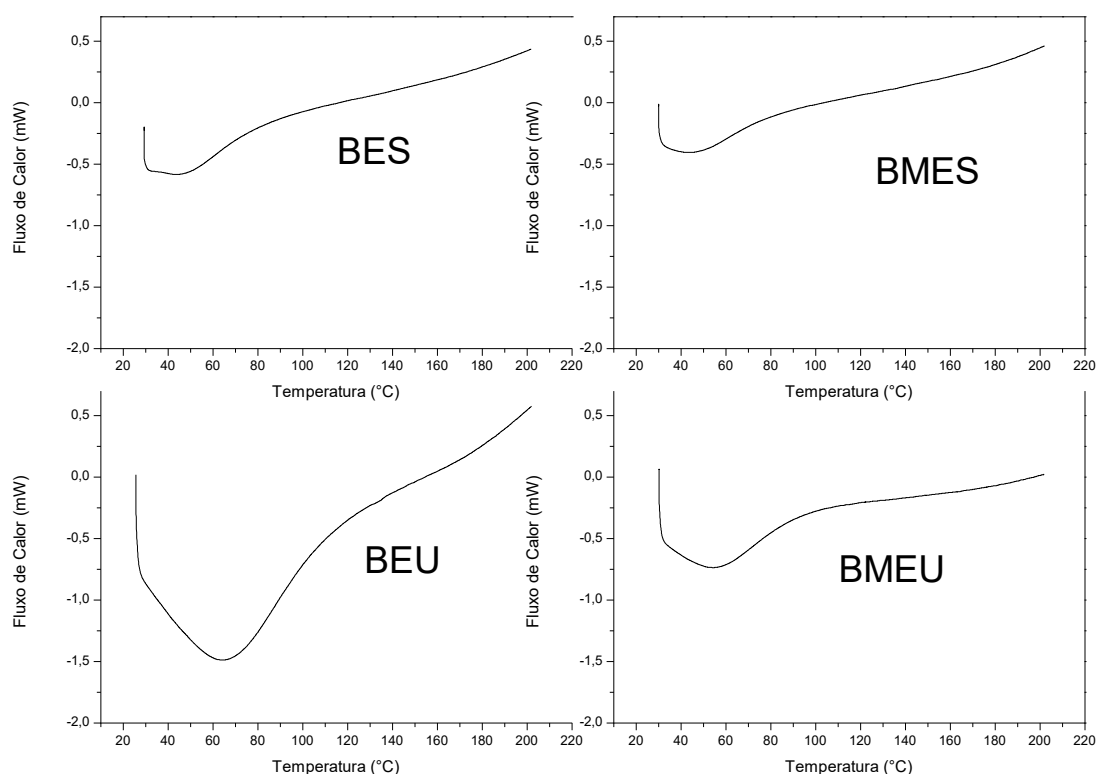


Figura 18. Curvas de DSC para os Biogéis purificados por via seca e úmida e suas respectivas modificações químicas

Esta definição da LCST corrobora os resultados obtidos em trabalhos anteriores onde se constatou a menor absorção de água pelos hidrogéis quimicamente modificados a temperatura de 36-37°C, que é a temperatura corporal (VIEIRA, 2015), sendo, portanto mais uma evidência do potencial de uso destes materiais para veículos de liberação de fármacos e outros importantes usos na promoção de saúde humana.

3.3. Caracterização dos Biogéis Modificados

3.3.1. Raios-X e Cristalinidade

Os índices de Cristalinidade, obtidos a partir das análises de raios-X, são apresentados na Tabela 13 e graficamente representados nos difratogramas de raios-X da Figura 19, demonstrando um baixo índice de cristalinidade da celulose nos biogéis *in natura* (12,35% para BES *in natura* e 14,63 para BEU *in natura*) e um aumento significativo de cristalinidade nos biogéis purificados (50,16% para BES e 21,30 para BEU). Este incremento na cristalinidade pode ser justificado pela saída de componentes que são amorfos, como lignina e extrativos, aumentando proporcionalmente a quantidade de celulose cristalina do material. Para BEU, entretanto, este resultado foi cerca de 50% menor em relação a BES, resultado ainda justificado pela forma de extração: como aquele foi obtido por meio de raspagem mecânica, possui essencialmente menos celulose que, por sua vez, é a responsável pelos picos de cristalinidade visualizados nos difratogramas. Em tempo, é importante mencionar que a celulose que compõe este biogel é originada de partes não lenhosas da árvore, justificando sua menor cristalinidade.

A baixa cristalinidade é um bom indicativo quando se pretende hidrolisar ou obter produtos por meio da modificação dos grupos OH da celulose, sendo uma alternativa de matéria-prima para obtenção de celulose de fibra curta com potencial para utilização como material de partida para obtenção de novos produtos (MESHITSUKA & ISOGAI, 1996).

Tabela 12. Índices de Cristalinidade dos biogéis extraídos por via seca *in natura*, após purificação oxidativa e modificados quimicamente

Amostra	Índice de cristalinidade (%)
BMEU	20,00
BEU	21,30
BMES	9,64
BES	50,16
BES <i>in natura</i>	12,35
BEU <i>in natura</i>	14,63

Após a incorporação do agente reticulante MBAAm, o índice de cristalinidade de BMES diminuiu consideravelmente. Esta diminuição demonstra que o agente reticulante conseguiu adentrar as cadeias celulósicas fortemente organizadas (celulose cristalina)

realizando a modificação química através dos grupos OH. Em BMEU, por já apresentar uma baixa cristalinidade inicial, esta redução foi mais discreta.

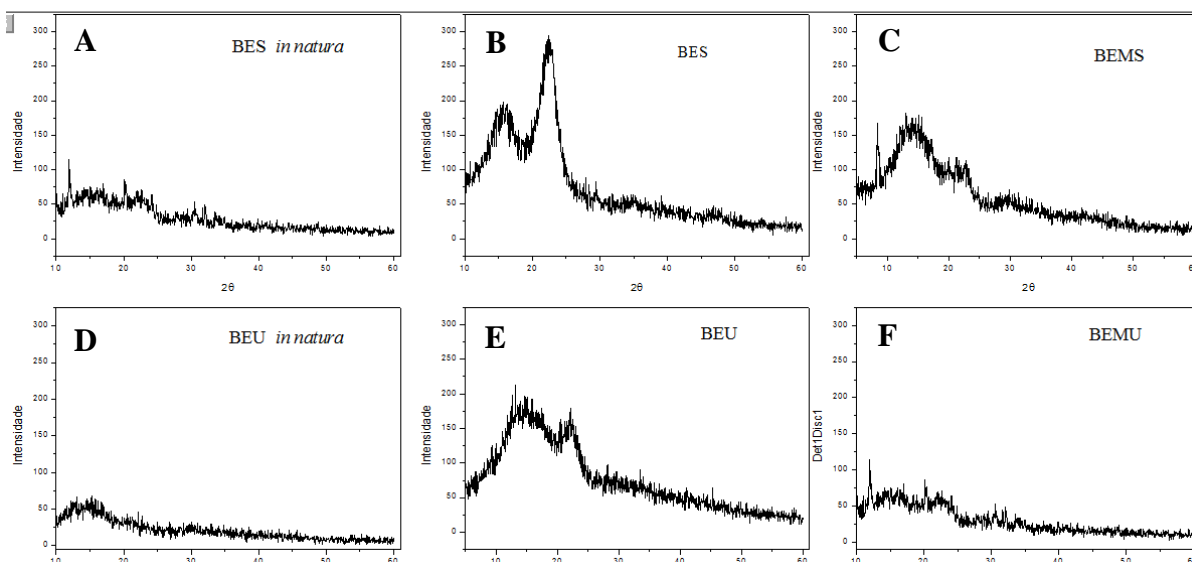


Figura 19. Análise de raios-X dos biogéis extraídos por via seca *in natura* (A e D), após purificação oxidativa (B e E) e modificados quimicamente (C e F) evidenciando a cristalinidade da celulose após a purificação e a quebra da cristalinidade após a modificação com MBAAM

3.3.2. Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X- EDX

A espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX) é uma análise qualitativa, não destrutiva que permite a aferição de vários elementos químicos presentes em amostra sólidas, assim como a determinação de suas concentrações com grande precisão, podendo atingir limites de detecção da ordem de 1 a 20 ppm (FERRETTI, 2009; FILHO, 1999).

Quando uma amostra é irradiada por um feixe de raios-X, os átomos na amostra geram raios-X "fluorescentes" que são emitidos da amostra. Tais raios possuem um comprimento de onda e uma energia que são característicos de cada elemento. Como a intensidade dos raios-X fluorescente é função da concentração, a quantificação é realizada pela medição da quantidade de raios-X com o comprimento de onda específico de cada elemento. (SHIMADZU, [s.d.]). Esta análise consiste, portanto, na excitação dos elementos que constituem a amostra, seguida da dispersão dos raios-X característicos emitidos e a sua posterior detecção (FILHO, 1999). Os índices encontrados estão representados na Tabela 13.

Tabela 13. Quantitativo de metais presentes nos hidrogéis BEU, BES, BMEU e BMES

Elemento (%)	BEU <i>in natura</i>	BES <i>in natura</i>	BMES	BMEU
S	0,583	0,654	38,689	18,059
Cl	0	0	0	0
K	82,493	88,233	16,295	64,352
Ca	15,852	10,104	3,422	6,356
Fe	0,411	0,541	0,413	2,938
Mn	0,176	0	0	0
Cu	0,103	0,281	0,043	1,054
P	0	0,187	0,808	0
Zn	0,159	0	0,152	0
Br	0	0	0,061	7,24
Co	0,064	0	0	0

Os metais encontrados nos materiais são típicos de biomassa lignocelulósica e são classificados como macro e micronutrientes. É notado ainda que em BEU os índices são ligeiramente inferiores a BES

Para os hidrogéis analisados, o elemento que poderia ser mais prejudicial na aplicação desses materiais em produtos de higiene pessoal ou de uso tópico em geral é o cloro em sua forma oxidativa, que pode ser irritativo em contato com a pele e mucosas. De acordo com o observado na Tabela 13, este elemento não foi detectado por esta técnica nos produtos purificados com peróxido alcalino, tratamento oxidativo substituído ao clorito acidificado.

Quando se analisa a incidência desses metais visando a aplicação na área da saúde e cosmética em geral, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sugere através da Resolução - RDC nº 44, de 9 de agosto de 2012 que o máximo aceitável para incidência de metais em corantes orgânicos artificiais usados em produtos de uso cosmético é de 500 ppm de Bário como BaCl₂; 3 ppm de Arsênico forma de As₂O₃; 20 ppm de Chumbo e 100 ppm para outros metais pesados. Os biogéis, portanto, não ultrapassam, o índice recomendado pela resolução quando se pretende aplicá-lo em produtos de uso cosmético. (BRASIL, 2012).

3.3.3. Grau de Intumescimento (Q)

O inchaço dos hidrogéis é explicado por Gibas e Janik (2010) como um processo complexo que compreende várias etapas. No primeiro passo, os grupos hidrofílicos polares da

matriz de hidrogel são hidratados pela água, que aparece na forma da água primária ligada. No segundo passo, a água também interage com os grupos hidrofóbicos expostos, que aparecem na forma de água ligada secundária. A água ligada primária e a água ligada secundária formam a água ligada total. No terceiro passo, a força osmótica atuante nas cadeias poliméricas trabalha no sentido de sua diluição. Entretanto, este fenômeno sofre resistência devido as reticulações físicas ou químicas. A água absorvida no equilíbrio é chamada de água livre, que preenche os espaços entre a rede ou as cadeias e o centro dos poros maiores.

No processo de absorção de água, parâmetros importantes tais como carga, concentração, pKa de grupos ionizáveis, equilíbrio hidrofílico a hidrofóbico, densidade de ligações cruzadas, grau de ionização, interação com o contra-íon no meio e cinética de controle de pH influenciam o grau de inchamento do hidrogel (MAHINROOSTA et al., 2018). O grau de intumescimento dos biogéis são demonstrados na Tabela 14. Após a modificação química, os biogéis modificados e extraídos por via úmida (BMEU) tiveram uma redução muito significativa na quantidade de água absorvida, passando de 148,5 g/g antes da modificação para 31g/g após a reticulação química.

Tabela 14. Grau de Intumescimento do Hidrogéis modificados quimicamente com MBAAm

Amostra	Intumescimento (Q) g/g
BMES	80,0
BMEU	31,0
BEU	148,5
BES	40,0
BEU <i>in natura</i>	161,0
BES <i>in natura</i>	44,8

A diminuição do inchamento em hidrogéis reticulados pode ser atribuída à redução nos microcanais, causando obstáculos na difusão da água e redução no movimento de cadeias poliméricas causadas pela presença de agente de reticulação (KOUSER et al., 2018). Este fenômeno foi observado por Bashir e colaboradores, (2018) que, estudando a reticulação química da goma Karaya, um polissacarídeo ácido, com MBAAm, constataram que o valor de Q aumentava com a diminuição da concentração de AAm. O mesmo efeito foi observado por Mukhopadhyay e colaboradores (2014) quando produziram hidrogéis de Quitosana copolimerizado com acrilamida com diferentes concentrações de agente de entrecruzamento.

A modificação química, entretanto, se mostrou eficiente para BES, resultado corroborado por estudo de modificação realizado em trabalhos anteriores (VIEIRA, 2015), o qual incrementa o grau de absorção de água em 50% sendo, portanto, efetivo no objetivo de potencializar as características do material. O inter cruzamento das cadeias poliméricas de BEU deve ser avaliado de acordo com sua possível aplicação, levando em conta outros fatores como estabilidade térmica e mecânica, por exemplo.

Quando se pensa em curativos de uso cutâneo, a estabilidade dimensional pode ser um fator mais importante que a elevada absorção de água, haja vista a extrusão do produto durante o envase, o manuseio pelo consumidor final, entre outros. Neste quesito, a modificação química é requerida e responsável pela elevação da resistência mecânica destes materiais, tornando-os atrativos para a utilização em produtos de aplicação na saúde humana.

3.3.4. Análises Texturais- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A estrutura morfológica dos Biogéis BMEU e BMES foram examinadas usando microscópio eletrônico de varredura, que revelou uma diferença estrutural entre os produtos. Os biogéis BMEU foram observados com a incidência de partículas esféricas com tamanho médio de 10 μm , densamente compactadas e estruturas fibrosas (Figura 20). Em BMES, também foi observado o surgimento de novas estruturas, entretanto, estas foram observadas na forma quadrada ou retangular (Figura 21). Estas estruturas podem ser atribuídas a modificação química dos biogéis, onde o agente de reticulação MBAAm pode realizar, além do entrecruzamento das cadeias de celulose através dos grupos OH, uma polimerização entre suas próprias moléculas. As aglomerações de microfibrilas de celulose observadas em BMEU podem ainda ser atribuídas à superfície altamente polar dessas fibras que causam agregações de pontes de hidrogênio interfibrilares (EL HALAL et al., 2015).

Choe e colaboradores (2018), na elaboração de géis de celulose, observaram a incidência dessas esferas na síntese de hidrogéis de celulose, atribuindo a alta resistência mecânica observada nesses materiais a ocorrência de esferas nanométricas densamente compactadas. O autor afirma ainda que o tamanho nanométrico das partículas pode ser o responsável pela alta resistência do hidrogel porque o pequeno tamanho aumenta a área de superfície específica como também diminui os interstícios entre as nanopartículas.

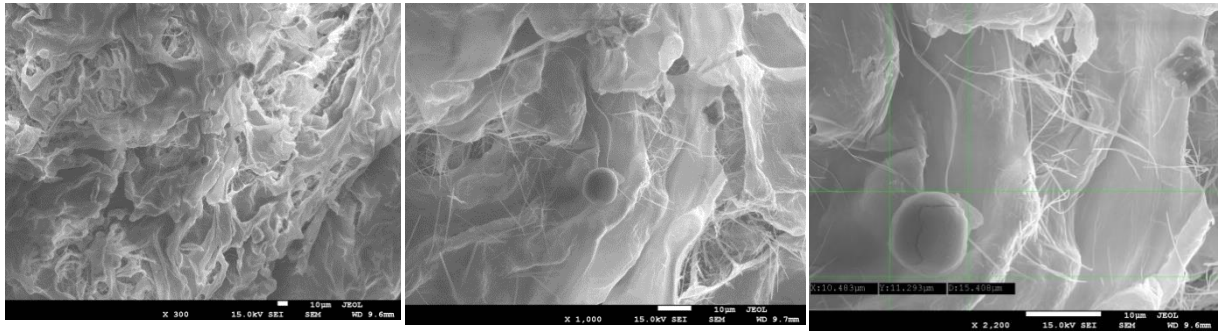


Figura 20. Micrografia Eletrônica do Biogel Modificado Extraído por via Úmida - BMEU - destacando a incidência de microesferas de polímero e microfibrilas de celulose. **Fonte:** o autor

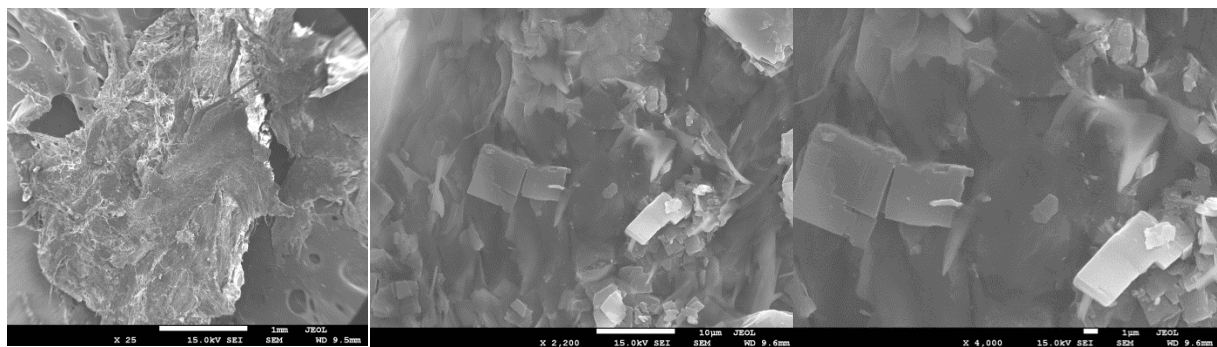


Figura 21. Micrografia Eletrônica do BMES liofilizado destacando a ocorrência de formação de estruturas poliméricas após a modificação química com Metileno-Bis-acrilamida. **Fonte:** o autor

Ambos os produtos possuem estruturas de poros e cavidades em pontos aleatórios de sua superfície, entretanto, no geral, apresentam estrutura escamosa. Segundo Liu e colaboradores (2014), uma estrutura do hidrogel com grandes orifícios são características de gel quebradiço, o que confere ao material uma boa rigidez mas pouca elasticidade. Ao contrário, uma estrutura escamosa é fácil de deslizar sob compressão, indicando que tem uma boa capacidade de deformação. Essas características foram observadas por estes pesquisadores na obtenção de hidrogéis de hemicelulose de milho interpenetrada com proteína isolada do leite, o qual exibiu redes duplas de polissacarídeos/proteínas interconectadas e interligadas, com estrutura mais regular e mais densa com orifícios pequenos, conferindo boa elasticidade e resistência ao hidrogel.

3.3.5. Caracterização Mecânica - Medidas de Viscosidade

Na indústria farmacêutica, as medidas de viscosidade são aplicadas principalmente para formas líquidas e semi-sólidas, pois representa um parâmetro importante no preparo e utilização das mesmas, como por exemplo o processo de mistura na fabricação, sua

extrussibilidade e fluidez no envase e sua manipulação pelo consumidor final ao verte-las do frasco ou o movimento de fazer sair o produto de um tubo sob pressão. O correto escoamento de um xampu ao sair do frasco ou o espalhamento de um creme sobre a pele também é totalmente dependente desta variável. (BRASEQ BRASILEIRA DE EQUIPAMENTOS LTDA, [s.d.]; NETZ, 2000). Ainda na indústrias cosmética e farmacêutica, a reprodutibilidade da viscosidade garante a consistência e o espalhamento dos produtos lote a lote, assegurando a qualidade tecnológica do produto acabado (CHORILLI; ZAGUE; LEONARDI, 2007).

A viscosidade desempenha um importante papel no aumento do tempo de dissolução dos hidrogéis em solução, sendo importante em materiais usados para liberação controlada de fármacos, onde a droga é liberada após o rompimento das cadeias do gel (BHUTANI et al., 2016). Ainda nestes materiais, a resistência mecânica é geralmente aumentada quando as interações físicas entre as cadeias poliméricas e seu emaranhamento são promovidas pelo aumento da concentração de polímero e / ou grau de polimerização (CHOE et al., 2018).

As medidas de viscosidade foram realizadas em viscosímetro rotacional Brookfields iniciando em temperatura de 5 °C, passando pela temperatura ambiente e finalizando em 42 °C. Estas temperaturas são importantes tanto para a conservação do produto em geladeira quanto para sua aplicação no copo humano, já que o biogel pode ser pensado como veículo para liberação de fármacos. Para a realização das medidas foram utilizados spindle S64 para BEU e BMES; spindle S63 para BES e para formulação de BMES + diclofenaco sódico (DS), de acordo com a faixa de viscosidade sugerida pelo fabricante do equipamento. Foram ainda considerados como faixa ideal de trabalho valores de torque acima de 10% e rotação de 3 a 60 RPM. Todas as medidas foram realizadas após estabilização da temperatura do produto, utilizando-se banho termostaticado e, após testes prévios, a rotação que melhor se ajustou foi entre 30 e 50 RPM. Os testes não foram realizados com BMEU pois o mesmo, após a reticulação química, não apresenta mais características de gel, ficando com aspecto de fibras de celulose semelhantes às do algodão hidrófilo. Tais características impedem que o rotor do viscosímetro rotacional trabalhe de forma a determinar a viscosidade do material.

A Figura 22 traz os reogramas de todas as amostras realizadas. Analisando as viscosidades aparente dos produtos, foi observado um decréscimo na viscosidade a medida que se aumentou a temperatura, comportamento já esperado. Entretanto, para BEU essa queda de viscosidade é mais acentuada com uma diferença de temperatura de 10 °C, passando de 3.000

para 1.000 cP. Essa queda também é observada em BES, mas com uma faixa de temperatura maior, 20 °C, o dobro do constatado em BEU. Para BMES+DS, o valor observado na viscosidade também cai pela metade desde o início do teste, a 5 °C até o final, a 42°C.

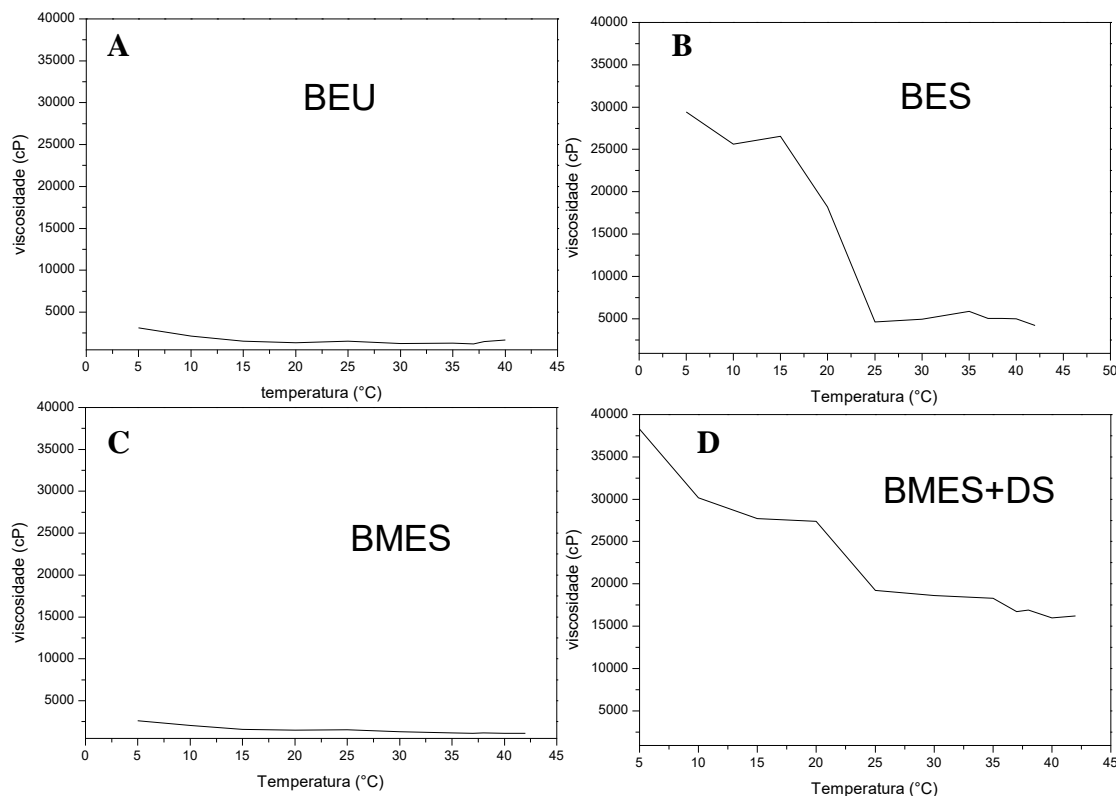


Figura 22. Viscosidade dos biogéis em diferentes temperaturas: em A Biogel extraído por via úmida e B Biogel extraído por via seca, ambos em intumescimento máximo. Em (C) Biogéis modificados e em associação de Diclofenaco Sódico (D) demonstrando o aumento da viscosidade da formulação

Apesar de serem produtos similares, possuem teores diferentes de matéria-prima, sendo este fator fundamental para determinar o comportamento da viscosidade. Enquanto BEU manteve uma faixa de viscosidade aparente em 1.000 cP, BES apresentou valores na ordem de 5.000 cP, ambos a partir da temperatura ambiente até 42 °C, no final do teste. Estes resultados podem também estar relacionados ao intumescimento máximo dos materiais pois, para BEU, este valor ultrapassa os 150 g/g enquanto que BES absorve 77 g/g, tendo uma quantidade de partículas sólidas proporcionalmente maior. Apesar da reticulação causar uma retração nas cadeias poliméricas e um consequente incremento de viscosidade, este comportamento não foi observado em BMES, ficando numa faixa bem menor que a observada em BES.

Hidrogéis de várias composições exibem reologia complexa, o que complica a ligação entre a mecânica e a química dos hidrogéis (BAI et al, 2019). A partir destes resultados, diversas aplicações podem ser pensadas para os diferentes materiais e faixas de viscosidade, haja vista esta ter um papel muito importante no aumento da resistência à dissolução dos hidrogéis (BHUTANI et al., 2016). Na liberação controlada de fármacos, este é um parâmetro importante pois, em viscosidade muito baixa, os hidrogéis permitem a liberação quase imediata dos fármacos (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). O aumento da viscosidade em formulações de uso ocular também teve sua eficiência comprovada como uma maneira de manter a droga injetada perto do local de injeção, que necessariamente era o local de ação da mesma, evitando, assim, que a formulação se deslocasse com os movimentos oculares (BARAR et al, 2016; JUNG et al, 2019)

Os biogéis foram ainda avaliados de acordo com seu comportamento à medida que se aumenta e diminui a velocidade de cisalhamento (taxa ascendente e descendente), a fim de serem classificados como sistemas newtonianos ou não newtonianos (Figura 23).

Fluidos não newtonianos são aqueles que não obedecem à lei da equação de fluxo proposta por Newton, ou seja, não possuem uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento. Neste caso, a viscosidade depende de fatores tais como estrutura da substância, pressão, forma de preparo, tempo de repouso (LAHOUD; CAMPOS, 2010; SILVA, 2018).

A maioria dos produtos cosméticos, apresentam fluxo não newtoniano, sendo ainda subdividido em três tipos de curvas de consistência: plástico, pseudoplástico e dilatante, sendo o fluxo pseudoplástico mais comum entre as formulações dermocosméticas (CHORILLI; ZAGUE; LEONARDI, 2007). Nesse tipo de fluxo, os materiais têm sua viscosidade diminuída gradualmente à medida que aumenta a velocidade de cisalhamento tornando o composto mais fluido e, portanto, sua viscosidade não pode ser expressa por um valor único, sendo obtida pela tangente em cada ponto da curva (MARTIN; BUSTAMANTE, 1993), por este motivo é chamada de viscosidade aparente. Tal viscosidade apenas tem significado se for indicada a velocidade de cisalhamento utilizada (LAHOUD; CAMPOS, 2010).

Todas as amostras de gel apresentaram características tixotrópicas em função das diferenças de tensão de cisalhamento e viscosidade aparente entre as curvas ascendente e descendente, fenômeno conhecido como *loop* de histerese. A tixotropia é um fenômeno que

ocorre quando a curva descendente se desloca para um plano inferior em relação à curva ascendente devido a uma recuperação lenta da consistência e organização do material, perdidas durante o cisalhamento. O fenômeno contrário é a reoplexia. O *loop* de histerese indica justamente a ocorrência dessa desorganização na estrutura do material, e a área dentro do *loop* é usada como um índice do grau desta ruptura (NETZ, 2002; MASSEY, 2002). Comportamento semelhante também é observado em outros produtos além dos cosméticos tais como gêneros alimentícios, por exemplo os iogurtes (ROCHA DOS SANTOS MATHIAS; CARLOS SILVA ANDRADE CÍNTIA LETÍCIA DA SILVA ROSA BÁRBARA AMORIM SILVA, 2013). Portanto, o entendimento da reologia é de fundamental importância para o desenvolvimento de novos produtos além de fundamentar as técnicas de controle de qualidade já existentes (LAHOUD; CAMPOS, 2010).

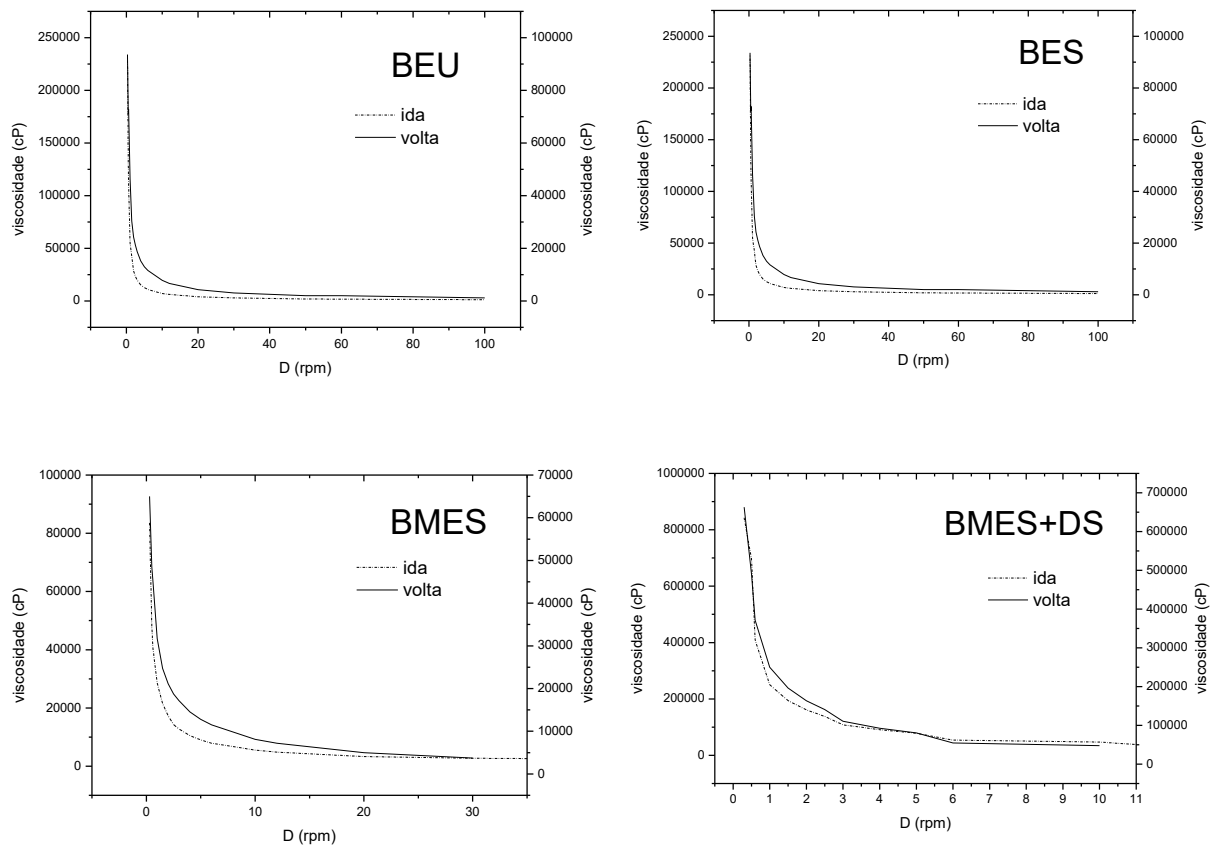


Figura 23. Comportamento pseudoplástico tixotrópico dos Biogéis

4 Conclusões

As modificações químicas em materiais hidrogéis permitem a preparação de materiais com diferentes composições, tamanhos e morfologias, otimizando não só suas características hidrofílicas como estruturais tais como estabilidade térmica, mecânica e controle de decomposição mediante sua aplicação (entrega de fármaco no organismo, por exemplo).

Nos biogéis extraídos por via seca e úmida (BES e BEU, respectivamente) as modificações químicas foram realizadas com incorporação química do agente de entrecruzamento N',N-metilenobisacrilamida (MBAAm). Por meio de análises de FTIR e TG/DTG pode-se observar a incorporação de MBAAm na matriz polimérica pelo surgimento de bandas características do grupamento amida e maior estabilidade térmica dos produtos finais. Pela difração de raios-X, é possível ainda notar um decréscimo no índice de cristalinidade dos materiais, demonstrando que o agente reticulante conseguiu adentrar as cadeias celulósicas fortemente organizadas realizando a modificação química através das hidroxilas disponíveis. As análises texturais mostraram ainda a aparência fibrosa e porosa do material além do surgimento de novas estruturas, que foram atribuídas a autopolimerização do agente de reticulação.

O produto que melhor atendeu as características de eficiência de absorção de líquidos após a modificação química foi BMES, o qual apresentou capacidade de absorver água mais de 80 vezes sua própria massa a temperatura ambiente. Os biogéis modificados e extraídos por via úmida (BMEU) tiveram uma redução muito significativa na quantidade de água absorvida, passando de 148,5 g/g antes da modificação para 31g/g após a reticulação química. Para este material, o entrecruzamento das cadeias poliméricas deve ser avaliado de acordo com sua possível aplicação, levando em conta outros fatores como estabilidade térmica e mecânica.

CAPÍTULO 3

APLICAÇÃO DOS HIDROGÉIS COMO VEÍCULO DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

1 Introdução

Os Sistemas ou dispositivos de liberação de fármaco (*drug delivery devices* – DDDs) são dispositivos ou formulações específicas que possibilitam a liberação de moléculas de uso terapêutico no corpo de uma maneira controlada ou retardada (NGUYEN et al., 2015; ULLAH et al., 2015). A disponibilização de um fármaco de maneira controlada permite que a concentração do mesmo permaneça dentro da dosagem terapêutica desejada por um período de tempo prolongado, facilitando a recuperação e aumentando a adesão do paciente ao tratamento (KONO; FUJITA, 2012). Além disso, modificar a forma de liberação pode ainda tornar a fórmula farmacêutica gastroresistente, iniciar a liberação após um período definido de tempo, reduzir os efeitos colaterais provocados por formas convencionais de administração do medicamento, etc.

Neste contexto, as matrizes poliméricas, em especial os hidrogéis, tem ganhado destaque por apresentarem vantagens tais como atoxicidade; intumescimento em água e fluídos biológicos; consistência elastomérica, o que minimiza o atrito entre tecidos e o hidrogel; alta porosidade, permitindo o fluxo de fluídos corpóreos; facilidade de obtenção; incorporação e liberação de moléculas de diferentes polaridades (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015; KONO; FUJITA, 2012). De forma importante, o tamanho da malha governa a forma como os medicamentos penetram na rede polimérica do hidrogel. Em escala molecular e atômica, várias interações químicas podem ocorrer entre o fármaco e a cadeia polimérica, sendo estas pré-projetadas usando estratégias físicas e químicas (MAHINROOSTA et al., 2018).

Para os sistemas de liberação controlada, a biodegradabilidade é fator limitante grave para implantes e biosensores, não sendo requerida neste caso. Entretanto, para a administração de medicamentos ingeridos por via oral é de muito interesse que o hidrogel seja facilmente degradado, seja pelo pH, temperatura ou outra variável do organismo humano (ULLAH et al., 2015).

1.1. Mecanismo de liberação controlada

Durante o período de administração de medicamentos ao paciente, podem ser observadas três diferentes concentrações da droga no organismo: a nível subterapêutico, em que a concentração do fármaco está abaixo da necessária; nível terapêutico, onde a droga age com função terapêutica no corpo; e nível tóxico, em que o fármaco, a altas concentrações, provoca efeitos deletérios a saúde do paciente.

A liberação controlada de um fármaco permite que a concentração do mesmo permaneça dentro da concentração ideal, ou seja, na dose terapêutica adequada ao tratamento por um período de tempo específico, reduzindo assim os riscos ao paciente bem como possíveis efeitos colaterais (KONO; FUJITA, 2012). Outros benefícios da utilização deste sistema são a prevenção da eliminação prematura do fármaco do organismo, aplicação do fármaco em locais específicos, auxilia a molécula a ultrapassar barreiras fisiológicas, entre outros (SANTOS MENEGUCCI et al., 2015). A Figura 24 demonstra esses três níveis comparando o sistema convencional e de entrega inteligente de fármacos.

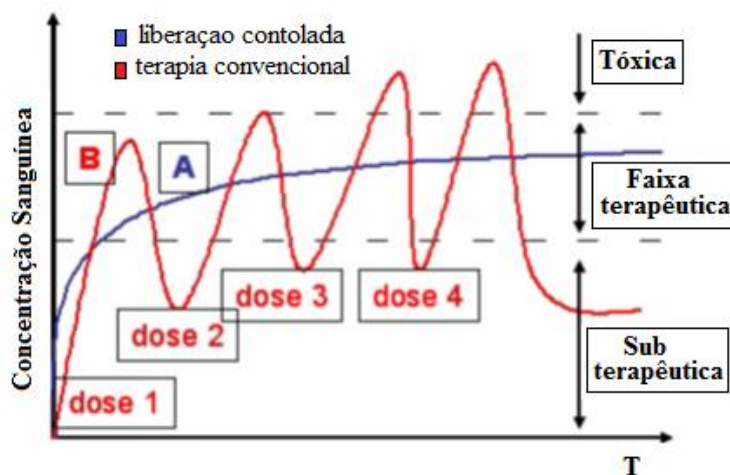


Figura 24. Gráfico comparativo entre a liberação controlada e administração convencional de fármacos. Fonte:(KONO; FUJITA, 2012)

Segundo a Farmacopéia Brasileira, formulações de liberação prolongada são aquelas cuja frequência na administração ao paciente é reduzida em relação aos tratamentos convencionais, o que aumenta a sua eficácia e segurança. O comportamento da liberação controlada pode se dar através de cinco perfis distintos. Em linhas gerais, se diferenciam pela a taxa de liberação do fármaco ao longo do tempo (BAJPAI; CHAND; MAHENDRA, 2013) (Figura 25). São eles:

- Perfil I: liberação de início retardado apresentando decaimento exponencial ao longo do tempo.
- Perfil II: liberação constante ou de ordem zero. A concentração da droga na corrente sanguínea é mantida a um nível otimizado e constante.
- Perfil III: retardamento significativo no início da liberação do agente ativo mantendo uma taxa constante na concentração.
- Perfil IV: atraso seguido por um pico de liberação do fármaco. Aplicado para entrega de hormônios, os quais muitas vezes requerem quantidades limitadas em vez de entrega constante.
- Perfil V: picos múltiplos em períodos especificados. Aplicado, por exemplo, na liberação de estradióis, os quais requerem picos de liberação ao longo de apenas 3 dias em cada mês.

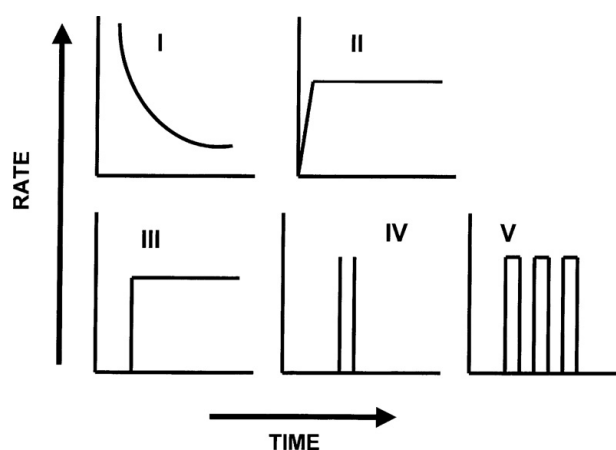


Figura 25. Perfis de liberação controlada de fármacos: I-Taxa de liberação que cai exponencialmente com o tempo; II- taxa de liberação constante, cinética de ordem zero; III- liberação de ordem zero com um atraso; IV- picos de liberação com atraso; V- liberação múltipla com atraso constante. **Fonte:**(BAJPAI; CHAND; MAHENDRA, 2013)

Sistemas de distribuição de medicamentos podem ser classificados de acordo com o mecanismo de controle da liberação da droga, sendo eles: difusão controlada do tipo reservatária ou monolítica, sistemas de controle químico, sistemas de solvente ativado e sistemas de liberação modulada.

Nos sistemas de liberação controlada do tipo monolítico o fármaco encontra-se disperso ou dissolvido uniformemente em toda a estrutura tridimensional do Hidrogel, enquanto nos sistemas tipo reservatório as moléculas encontram-se concentradas no núcleo do sistema

revestidas com uma membrana de hidrogel para permitir uma taxa de liberação constante (Figura 26).

Ambos permitem a liberação da droga por difusão através da malha de hidrogel ou o preenchimento dos poros com água (intumescimento), entretanto, em sistemas de matriz, a taxa de liberação inicial é proporcional à raiz quadrada do tempo, em vez de ser constante e independente do tempo como acontece em sistemas de reservatório (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015).

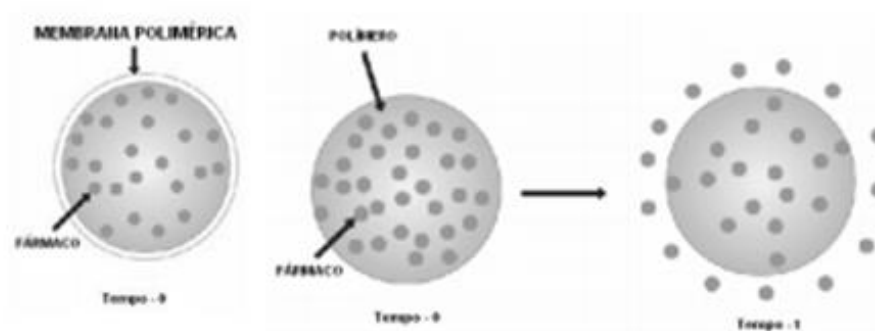


Figura 26. Representação de sistemas de liberação de medicamentos do tipo Monolítico (esquerda) e Reservatório (direita). **Fonte:** (VITOR SALMORIA; ALBERTO KANIS, [s.d.]

A velocidade de liberação do fármaco, nestes tipos de sistemas, é condicionada a pelo menos um dos seguintes mecanismos cinéticos (RANGA RAO; PADMALATHA DEVI, 1988):

- Transporte do meio de dissolução para a matriz polimérica;
- Intumescimento do polímero;
- Difusão do fármaco através das cadeias tridimensionais de polímero intumescido;
- Erosão do polímero intumescido.

Em sistemas de entrega de fármaco controlada quimicamente, a liberação de um agente farmacologicamente ativo geralmente ocorre em meio aquoso por meio da Biodegradação gradual do sistema polimérico ou de suas ligações, através das quais as moléculas do fármaco são acopladas ao Hidrogel. É a chamada erosão do polímero, ou seja, suas cadeias sofrem ruptura.

Nos sistemas controlados pelo grau de intumescimento, o fármaco é liberado à medida que o solvente provoca o relaxamento das cadeias tridimensionais do polímero: dissolvidas, as moléculas do composto ativo difundem para o exterior do Hidrogel.

Já nos sistemas de liberação Modulada, a liberação do fármaco é controlada por estímulos externos, tais como temperatura, pH, força iônica, campo elétrico, radiação ou luz UV, etc. São os hidrogéis responsivos ou hidrogéis inteligentes. Eles podem sofrer aumento ou diminuição no grau de intumescimento, mudança na estrutura tridimensional, alteração da resistência mecânica e permeabilidade à medida que são expostos a estes fatores externos (AOUADA; MATTOSO, 2009).

Um hidrogel Termoresponsivo apresenta transição de fase dependente da temperatura. Este fenômeno ocorre quando um dos componentes do hidrogel é insolúvel no meio, abaixo ou acima da chamada temperatura crítica (em Inglês *Lower Critical Solution Temperature* – LCST e *Upper Critical Solution Temperature* – UCST).

Abaixo da LCST, as ligações de Hidrogênio realizada pelos grupos OH da celulose e hemicelulose com a água são predominantes, favorecendo a solubilidade do polímero no meio. Em contrapartida, acima da LCST, as ligações de Hidrogênio se enfraquecem e o hidrogel se desidrata compactando a cadeia polimérica. No geral, a característica comum dos hidrogéis termosensíveis é a presença de grupamentos CH_3 , C_2H_5 e C_3H_7 (BAJPAI; CHAND; MAHENDRA, 2013). Alguns derivados da celulose são ainda reportados na literatura como sensíveis a temperatura, como a metilcelulose (MC) e hidroxipropilcelulose (HPMC) exibindo LCST aproximada de 80 e 55°C, respectivamente (LIMA, 2014).

Este efeito é interessante para os sistemas de entrega de fármacos onde a substância é adicionada a matriz do hidrogel em temperaturas abaixo da LCST e, ao ser ingerido, sua temperatura entra em equilíbrio com a temperatura corpórea (maior que a LCST) fazendo com que o hidrogel sofra retração e libere água juntamente com o medicamento (BAJPAI; CHAND; MAHENDRA, 2013; GONZALEZ, 2008). O esquema deste mecanismo pode ser melhor compreendido na Figura 27.

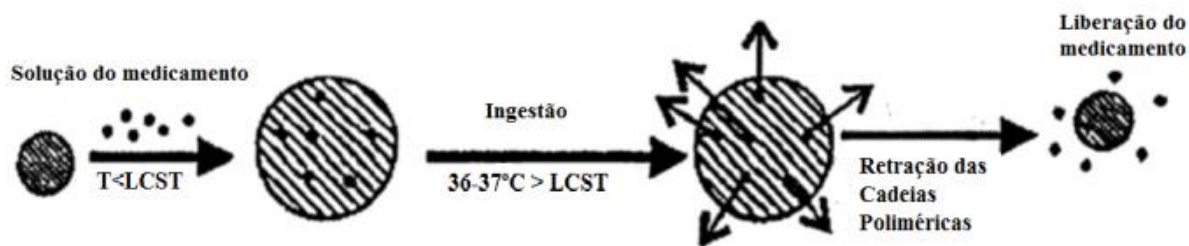


Figura 27. Sistema de entrega de medicamento por Hidrogéis Termoresponsivo: o Hidrogel é submetido a intumescimento em solução do fármaco e, ao ser submetido à temperatura superior a sua LCST, sofre retração das cadeias liberando o fármaco. **Fonte:** Bajpai, Chand e Mahendra (2013)

Outro tipo de hidrogéis responsivos bastante utilizados na liberação inteligente de fármacos são os pH-responsivos. Nestes sistemas, o pH pode variar o volume do hidrogel sempre que o mesmo possua grupos funcionais ionizáveis, ocorrendo a protonação e desprotonação destes grupos em torno dos valores de pKa. Se estes grupos são carboxílicos, o aumento do pH provoca um aumento da hidrofiliabilidade da rede tridimensional e, por conseguinte, o intumescimento. Mas se o polímero contém grupos aminas, este efeito é provocado pela diminuição do pH (ARREDONDO-PEÑARANDA; LONDOÑO-LÓPEZ, 2014; NGUYEN et al., 2015).

Um sistema de pH responsivo bem concebido pode ser aplicado para a entrega de agentes bioativos para qualquer local no corpo humano, tais como o estômago, intestino e vasos sanguíneos (NGUYEN et al., 2015).

Esta resposta destes tipos de hidrogéis são inclusive, aplicada em sistemas de liberação de insulina, onde a molécula alvo é protegida pelo hidrogel durante sua passagem pelo estômago, cujo pH é ácido, sendo liberada somente no intestino, com valores básicos de pH (MUKHOPADHYAY et al., 2014).

1.2. Formas de Aplicação dos hidrogéis nos sistemas de liberação controlada

As vias de administração de formulações à base de hidrogel incluem transdérmica, oral, nasal ou parentérica.

1.2.1. Uso tópico

A aplicação tópica de hidrogéis pode ser utilizada para sistema de entrega de drogas que podem ajudar a aliviar os sintomas de muitas condições patológicas. O uso de hidrogéis

como curativos têm ganhado mercado e obtido resultados satisfatórios (KONO; FUJITA, 2012). O alto teor de água destes materiais torna-os indicados para promover o desbridamento autolítico (remoção de tecidos mortos pela ação do próprio organismo do paciente e promovido por produtos que garantam a umidade adequada na ferida) e estimular a cicatrização em feridas secas, superficiais ou profundas com ou sem infecção, necrose ou esfacelo (tecido morto de coloração amarela ou acinzentada, mucóide e pouco aderido ao leito da lesão). As estruturas de hidrogel permeáveis permitem ainda a troca de CO_2 , O_2 e H_2O vapor, permitindo que o tecido "respire" (MAHINROOSTA et al., 2018).

Além disto, o hidrogel é ideal para a manutenção da viabilidade de ossos e tendões expostos em feridas profundas. A Figura 28 mostra o mecanismo de ação do curativo de hidrogel na ferida: enquanto o gel promove um ambiente úmido que facilita o processo de cicatrização através da hidratação, conduz ao desbridamento além de absorver os exsudados produzidos por ela. Pode ainda provocar alívio de dores locais pela umidificação das terminações nervosas expostas na ferida e estimular a formação de novos vasos sanguíneos.

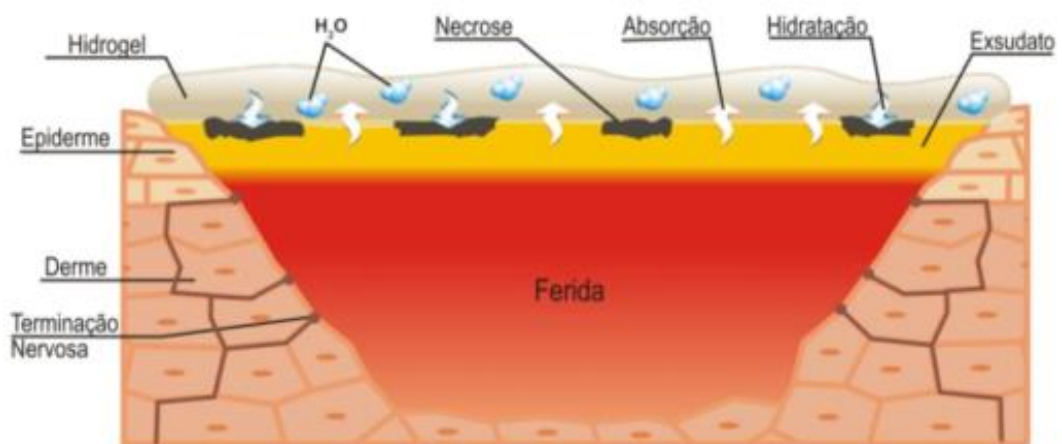


Figura 28. Mecanismo de ação dos curativos de hidrogéis: além de absorver os exsudados, o gel promove um ambiente úmido que facilita o processo de cicatrização da pele através da hidratação

1.2.2. Uso ocular

Os hidrogéis podem ainda ser usados para liberação controlada de fármacos na forma de colírios, sendo eficiente no tratamento de doenças oculares. Cada região do globo ocular está suscetível a um tipo diferente de enfermidade que requer tratamentos via diferentes rotas de administração, utilizando para isto várias modalidades. As diferentes partes que constituem o olho podem funcionar como barreiras para a administração da droga devido as

suas características como espessura, polaridade, conteúdo de colágeno, hidrofiliçidade, carga superficial, etc. A conjuntiva, por exemplo, é citada como um importante local de perda através do qual as drogas administradas topicamente acabam na circulação sistêmica, em vez de agir sobre o olho. Coletivamente, esses fatores levam à redução do tempo de residência da droga no olho, à absorção ocular comprometida e à biodisponibilidade, exigindo a administração frequente de medicamentos (AL-KINANI et al., 2017).

Nestes casos, a administração tópica *in situ* pode efetivamente prolongar o tempo de retenção e evitar a rápida drenagem do ativo do local de aplicação a partir do sistema nasolacrimonial do globo ocular. Este tipo de aplicação foi utilizada no tratamento de glaucoma utilizando hidrogéis termosensíveis de quitosana como formulação de colírio para a liberação prolongada de latanoprost, ativo utilizado no controle da hipertensão ocular, principal causa de glaucomas (CHENG et al., 2016a).

Outra forma de aplicação em uso ocular está relacionada ao tratamento da degeneração macular relacionada à idade - DMRI - uma doença da retina recorrente em pessoas acima dos 50 anos e que leva a perda progressiva da visão (AMERICAN OPTOMETRIC ASSOCIATION, [s.d.]; KERSTEN et al., 2018). Na tentativa de tratamento para esta enfermidade, Egbu e colaboradores (2018) utilizaram hidrogéis de ácido hialurônico e ácido hialurônico/Poli(N-isopropilacrilamida) na liberação de anticorpos (Infliximab), atingindo uma taxa de liberação de 90–100% de depuração de proteínas num período de 7–10 dias.

1.2.3. Comprimidos Vaginais

Um dos exemplos de sucesso de hidrogéis para sistemas de liberação vaginal é utilizado no final da gravidez e administrado na paciente a fim de induzir o trabalho de parto. Cada pastilha contém dinoprostona (prostaglandina E2 ou PGE2) e libera o fármaco ao longo de um período de 12h a cerca de 0,3 mg/h. A liberação do fármaco é acionada pelo inchaço do hidrogel quando colocado ambiente úmido do canal vaginal.

1.2.4. Subcutâneo

As formas subcutâneas de uso dos hidrogéis são destinadas a liberação de hormônios como gonadotrofina, indicado para tratamento em crianças que apresentam puberdade precoce. O sistema fica ativo sobre a pele do paciente por até doze meses, sendo

retirado após este período de tempo, caso a matriz polimérica utilizada não seja absorvida pelo organismo (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015).

1.2.5. Uso oral

Dispositivos de hidrogel foram sugeridos para a liberação controlada por via oral de diferentes ingredientes ativos tais como anti-inflamatórios não-esteróides. Eles podem ser usados para proteger drogas ou proteínas como a insulina, por exemplo, que são sensíveis à degradação proteolítica que ocorre no estômago (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015; MUKHOPADHYAY et al., 2014). Para este fim, são utilizados hidrogéis pH-responsivos que apresentam modificação no seu comportamento de intumescimento em meio básico ou neutro.

1.2.6. Cápsulas de controle da obesidade

Algumas alternativas tecnológicas tem sido apresentadas com o objetivo de auxiliar os profissionais da saúde no controle de peso de seus pacientes. Opções que envolvam um menor risco ao paciente atreladas a um resultado satisfatório é um dos objetivos dos pesquisadores desta área. Um recurso estudado para este fim constitui a aplicação de cápsulas de hidrogéis, conhecidas comercialmente como Gelesis 100. Este produto é uma nova intervenção que consiste em uma cápsula preenchida com um hidrogel biocompatível que se expande no estômago depois de absorver água. O material expandido resulta em aumento do volume intragástrico causando, saciedade precoce. Este dispositivo também atua como uma barreira à absorção de glicose no intestino delgado, funcionando como um mecanismo restritivos, induzindo a má digestão e má absorção de nutrientes para então conduzir a perda de peso, princípio semelhante à cirurgia bariátrica (NEWBERRY; PIKETT-BLAKELY, 2016). Dados iniciais utilizando este produto mostraram que uma proporção significativamente maior de indivíduos com sobrepeso / obesidade em de tratamento perdeu 10% de seu peso corporal basal em comparação com o placebo. Os efeitos adversos foram semelhantes em ambos os grupos.

Ainda na área nutricional, géis naturais podem ser utilizados como espessantes de alimentos em substituição a outros comercialmente conhecidos e tradicionalmente utilizados em confeitaria como açúcar e creme de leite, oferecendo um produto reduzido em calorias (NEPOVINNYKH et al., 2018).

2 Material e Métodos

2.1. Simulação de absorção de fluidos biológicos - suco gástrico

A capacidade de absorção de água e/ou fluidos biológicos dos produtos foram determinados segundo metodologia JIS – Padrão Industrial Japonês K7223, descrita por Yoshimura, Matsuo e Fujioka (2006) a qual utiliza folhas de nylon de porosidade de 255 Mesh e dimensões de 100 mm x 200 mm para a realização dos ensaios. 100 mg de BEU e BES foram introduzidas em saquinhos produzidos a partir das folhas de nylon e estes imersos nas soluções testadas: suco gástrico sintético pH 1, 2 e 3.

2.2. Modificação da estrutura – adsorventes de óleo

Após a purificação, os biogéis foram submetidos a uma esterificação, modificação química de sua estrutura onde ocorre a troca dos grupos hidroxílicos (OH) por grupos acetatos, gerando materiais com propriedades adsorventes. Esses novos materiais podem ser utilizados para diversos fins desde remoção de óleos até como produtos de nutrição, atuando como adsorventes de óleos (HOKKANEN; REPO; SILLANPÄÄ, 2013; OLIVEIRA et al., 2017a; VINÍCIUS et al., 2008).

2.3. Esterificação dos materiais

A reação de esterificação é conhecida por proceder a esterificação completa de todos as três hidroxilas da anidro- d - glicose quando é efetuada numa fase homogênea (isto é, quando a celulose é dissolvida), mas no caso de fibras, quando a reação está heterogênea, este fenômeno é mais raro (ASHORI et al., 2014; HU et al., 2011). Neste caso, os grupos hidroxílicos que reagem são aqueles pertencentes aos menores constituintes da fibra do hidrogel, isto é, hemiceluloses e celulose amorfa (ASHORI et al., 2014)

Para a reação de esterificação, 5,0 g de BEU foi colocado em um balão volumétrico de 500 mL, juntamente com 200 mL de anidrido acético e 0,5% (6,07 mmol) de catalisador N-bromossuccinamida – NBS (em relação à massa de anidrido acético), o balão foi acoplado a um condensador e introduzido em um banho de óleo a 120 °C por 4 horas com agitação. Após a reação, as amostras foram filtradas e lavadas com álcool etílico e acetona para remoção do anidrido não reagido e ácido acético, coproduto da reação.

Durante a reação de esterificação alguns grupos OH do biogel são trocados por grupos acetil, os quais tem maior massa molecular (BRUM, 2007; BRUM et al., 2012; HU et al., 2011). Logo, os materiais após a reação devem apresentar maior massa do que o material não reagido. As amostras foram, então, pesadas antes de depois da reação de esterificação e a quantificação do ganho de massa definida por meio da Equação 8.

$$WPG = \frac{(M \text{ material acetilado (g)} - M \text{ material não acetilado (g)})}{(M \text{ material não acetilado (g)})} \times 100 \quad (8)$$

Outro método de se comprovar a ocorrência das modificações químicas é a hidrofobicidade. Para isso, os produtos foram submetidos a um teste de adsorção de óleo vegetal.

2.4. Capacidade de Adsorção de óleo em suco gástrico (AO)

Para a realização deste teste, os biogéis esterificados foram secos em estufa a 60 °C por 24h. Os materiais produzidos foram testados quanto a sua capacidade de absorver óleo presente em suco gástrico e, para isso, foi montado um sistema contendo HCL pH 2 e óleo de soja na proporção de 4:1 e, aproximadamente, 0,1 gramas de produto. O sistema foi agitado por 30 minutos. Após o teste, os biogéis esterificados foram filtrados em filtro de polipropileno (TNT), secos em estufa e a quantidade de óleo de soja absorvida foi determinada gravimetricamente de acordo com a seguinte Equação 9.

$$AO_{(g/g)} = \frac{M_{\text{biogel+óleo}} - M_{\text{biogel}}}{M_{\text{biogel}}} \quad (9)$$

Onde $M_{\text{biogel+óleo}}$ refere-se à massa de biogel modificado após a adsorção de óleo e M_{biogel} é a massa inicial de biogel modificado. O teste realizado com solução estomacal visa estabelecer similaridade do biogel modificado com produtos destinado ao emagrecimento que já estão disponíveis no mercado, tal como QuitoPlan© (LHP Brasil), um combinado de gel adstringente e fibras de quitosana e Psyllium, o qual promete absorver e eliminar gordura do organismo (<https://quitoplan.com.br/>. Acesso em 30/06/2019, 17:00h).

2.5. Simulação da Digestão

Os materiais obtidos foram submetidos a testes de digestibilidade em ambiente controlado simulando as características do estômago humano. Modelos *in vitro* de digestão gastrointestinal fornecem uma abordagem controlada para comparar alimentos em termos de seus comportamentos físicos e químicos no estômago e intestinos (OVERDUIN et al., 2015).

O modelo é explicitado por Heshmati et al (2011) e Peixoto (2016), e foi adaptado para a realização deste ensaio com os biogéis utilizando um balão de fundo redondo de 2,0 L (tamanho e forma equiparados a um estômago humano típico). Primeiro, 50 mL de líquido gástrico (pH 1,5), 250 mL de água e 50 g de gel são adicionados ao balão. Em seguida, 200 mL de líquido gástrico (pH 7) e 2,0 mg/mL de pepsina foram adicionados de modo que um volume total de 500 mL, necessários para um ótimo funcionamento do modelo, seja alcançado. Este passo é seguido por acidificação usando HCl 1 mol.L⁻¹. A taxa de acidificação permite que o meio atinja um pH de 2 após aproximadamente 50 minutos, que é uma taxa típica de acidificação do estômago após o café da manhã (HESHMATI et al., 2011). Todo o teste foi realizado em mesa agitadora com velocidade de 60 RPM por 2 h a 37 °C.

2.6. Teste de estabilidade acelerada

Seguindo as recomendações do Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da Agencia Nacional de vigilância Sanitária ANVISA (2009), este estudo foi iniciado com o objetivo de prever a vida útil dos biogéis e sua estabilidade. Segundo este guia, os testes devem ser conduzidos sob condições que permitam fornecer informações sobre a estabilidade do produto num intervalo de tempo reduzido. Para tanto, deve-se criar um cenário com condições reais e passíveis de ocorrer durante o prazo de validade do produto.

Na realização deste ensaio, os biogéis foram submetidos a duas condições diferentes: acondicionamento em geladeira, com temperatura a 5 °C e a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A cada intervalo de 7, 15, 30, 60 e 90 dias foram realizadas medições de pH e densidade além de avaliação das características físicas como aspecto, cor e odor.

O pH foi medido utilizando potenciômetro de bancada após aferição diária da calibração. As medidas de densidade foram realizadas gravimetricamente a temperatura

ambiente em picnômetro de 50 mL e em triplicatas. O cálculo para a densidade é verificado pela relação entre massa e o volume de acordo com a seguinte Equação 10.

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (10)$$

Na qual,

ρ = densidade da amostra em [g.cm⁻³]

m = massa da amostra em [g]

V = volume final em [cm⁻³]

2.7. Ensaios analíticos organolépticos e físico-químicos

Na indústria cosmética, a realização dos ensaios analíticos ocorre logo após a conclusão do estudo de estabilidade do produto pois, caso o primeiro apresente separação de fase ou qualquer outra não conformidade, o processo não é continuado. Os ensaios analíticos seguem as recomendações do Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2009) e se dividem em organolépticos e físico-químicos.

Ensaios organolépticos são procedimentos utilizados para avaliar as características de um produto, o aspecto, a cor, odor, o sabor e o tato. São procedimentos verificados de forma sensível por abranger os órgãos de sentido do analista. Os ensaios organolépticos realizados nos biogéis são: aspecto, cor e odor. Cada um desses parâmetros é descrito a seguir:

- Aspecto – A amostra é observada visualmente e é verificado se as características macroscópicas da amostra foram mantidas ou se ocorreu turvação, precipitação ou perda de viscosidade;
- Cor – Compara-se a cor da amostra visualmente com o padrão de referência;
- Odor – Através do olfato compara-se o perfume da amostra com o perfume da amostra padrão de referência com o objetivo de verificar a conformidade entre elas.

O padrão de referência das análises organolépticas para os biogéis purificados por via seca e úmida, é descrito no Quadro 2.

Quadro 2: Especificações organolépticas dos biogéis

ESPECIFICAÇÃO DOS BIOGÉIS		
Tipos de Análises	Especificação Referência	
	BES	BEU
Aspecto	Gel	Gel
Cor	Branco/ transparente	Transparente
Odor (cheiro)	Inodoro	Inodoro
Densidade (g/cm ³)	1,028	1,018

Já os ensaios físico-químicos são utilizados para especificar as características dos produtos. Para produtos cosméticos, estes ensaios são: medida de viscosidade, medida de pH e medida de densidade. As medidas de viscosidade, densidade e pH foram analisadas de acordo com metodologia descrita em 1.15.7 do Capítulo 2 e 1.23 deste Capítulo.

2.8. Teste de Biotoxicidade- Artemia Salina

Artemia sp. é um organismo utilizado como modelo marinho para estudos de ecotoxicidade devido à sua facilidade de cultura, disponibilidade imediata, baixo custo e adaptabilidade. Durante condições adversas, a *Artemia* produz cistos adormecidos que podem ser eclodidos pela reidratação em água salgada, mesmo depois de vários anos (Lavens e Sorgeloos, 2000).

O ensaio de toxicidade com *Artemia* salina foi realizada através da adaptação da metodologia de Meyer et al. (1982): Anteriormente à realização dos ensaios, os cistos de *Artemia* salina foram eclodidos em cubas de vidro contendo 1,0 L de solução salina 30 g/L com pH 8,0. A iluminação foi mantida por 24h com lâmpada incandescente de 40W (Figura 29). Os náuplios foram utilizados para os experimentos após 24-48 h de incubação (MADHAV et al., 2017).

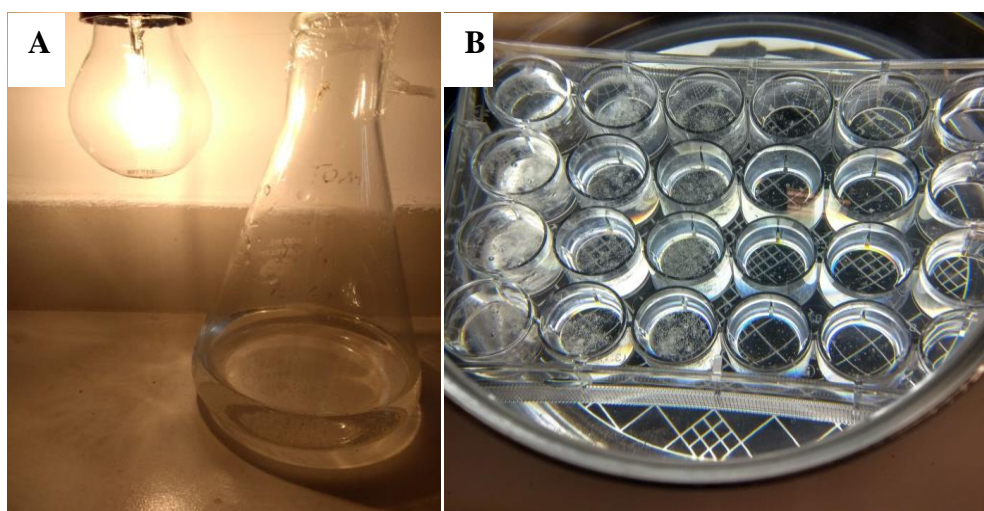


Figura 29. Ensaio de toxicidade utilizando *Artemia Salina*: em a) eclosão dos ovos sob iluminação artificial e b) execução do ensaio em placa de 24 poços utilizando os náuplios de *Artemia*. **Fonte:** o autor

Para a realização dos testes de toxicidade, foram utilizadas placas de 24 poços com volume de 2 mL e 10 animais em cada poço (Figura 27b). Os géis foram utilizados em intumescimento máximo em água destilada nas concentrações de 0.00025/ 0.0005/ 0.0025/ 0.00125/ 0.005 mg/mL, sendo realizados cada concentração em quadruplicata. Todo o ensaio foi conduzido em temperatura ambiente e um teste em branco foi mantido somente com solução salina para controle. A contagem dos animais mortos e vivos realizada após 12 e 24 horas e realizado cálculo para Dose Letal Média (CL_{50}).

Monitorou-se por 24h a microplaca, com intuito de contar as *Artemias* mortas. O percentual de mortes é calculado de acordo com a seguinte Equação 11.

$$\% \text{ mortas} = [(\text{teste} - \text{controle}) * 100] / \text{controle} \quad (11)$$

2.9. Determinação do Ponto de carga Zero (PCZ)

Para a determinação do ponto de carga zero foi utilizado o Experimento de 11 pontos sugerido por Robles Advisor e Regalbutto (2004), onde se utiliza 50 mg dos biogéis purificados em 50 mL de solução aquosa com valores de pH variando de 1,0 a 12 em béquer de 100 mL, os quais foram transferidos para uma mesa agitadora sob velocidade constante de 10 RPM por 24 horas. Após esse período de equilíbrio, mediu-se o pH final com o auxílio de um pHmetro de bancada devidamente calibrado. Em seguida, os gráficos de pH inicial *versus*

pH final foram plotados e o valor de PCZ obtido na faixa onde se observou o efeito tampão. Toda a análise foi realizada em triplicata.

2.10. Análises Texturais - Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises morfológicas dos biogéis incorporado ao Diclofenaco Sódico após liofilização foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura modelo JSM-7001F da Jeol no laboratório de Microscopia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, de acordo com metodologia descrita no Capítulo 1

2.11. Simulação de Liberação em Uso Tópico - Modelo de Dissolução Sem Membranas

2.11.1. Incorporação de Diclofenaco e Anfotericina-B ao Biogel

Para os testes de liberação, foram utilizados o biogel purificado extraído por via úmida (BEU) liofilizado. O mesmo foi intumescido até sua capacidade máxima com solução do fármaco escolhido: para Diclofenaco Sódico foi utilizado a concentração em massa de 10 mg e para Anfotericina-B, 1 mg em cada célula de liberação *in vitro*. Todas as formulações foram feitas 1h antes dos testes de liberação.

2.11.2. Liberação de Diclofenaco Sódico

A liberação *in vitro* de Diclofenaco Sódico (DS) a partir dos hidrogéis carregados com o fármaco foi investigada de acordo com metodologia adaptada de Li et al. (2011), Bashir et al.(2018) e Santos Menegucci et al. (2015), utilizando soluções tampão de pH 7,5; pH 5,0 e pH 9,0 a 36,5 °C, temperatura média corporal e em condição *sink*, isto é, em meio de dissolução com concentração de DS equivalente a até 10% da concentração de saturação (ABDOU, 1989), que no caso é de 6,0 mg/mL .

Para isto, os hidrogéis carregados com fármaco foram imersos em 25,0 mL de cada solução tampão preparada e colocados em mesa agitadora com controle de temperatura com rotação média de 100 rpm. A retirada de alíquotas se deu em intervalos de 15 minutos com posterior reposição de tampão, em volume de 2,0 mL. A determinação da concentração de DS foi realizada em espectrofotômetro UV-visível a 295 nm (GOH et al., 2014). Esse processo foi

continuado até a liberação máxima ou até que a concentração de DS ficasse constante no meio. Os experimentos de liberação foram realizados em triplicata.

2.11.3. Liberação de Anfotericina-B modificada

A anfotericina-B (AmB) é um fármaco de solubilidade muito baixa em água (1 µg/ml) em pH fisiológico, contudo, as doses recomendadas de AmB variam de 1 a 1,5 mg/kg/dia podendo atingir o máximo de 4 mg/kg/dia. Para superar este gargalo, várias estratégias têm sido tentadas, tais como lipossomas, cocleatos, complexos lipídicos e nanoesferas. Algumas dessas modificações melhoraram o índice terapêutico do fármaco e reduziram os efeitos adversos, o qual o maior deles é a nefrotoxicidade (PETRIKKOS, 2009; SALERNO et al., 2013).

Para a execução deste teste, foi desenvolvido uma formulação que foi capaz de aumentar a solubilidade da AmB através da adição de C-dots à molécula de Anfotericina-B. Esta tecnologia está sob pedido de registro de patente e não será descrita neste trabalho.

A liberação *in vitro* de Anfotericina-B a partir dos hidrogéis carregados com o fármaco se deu de forma semelhante ao DS, utilizando solução tampão de pH 7,4 a 36,5 °C e em condição *sink*. No caso desta formulação, a solubilidade é de 1,0 mg/mL, sendo utilizado um volume de tampão de 10 mL para cada liberação. O conjunto foi colocado em mesa agitadora com controle de temperatura com rotação média de 100 rpm e a retirada de alíquotas se deu em intervalos de 60 minutos com posterior reposição de tampão, em volume de 1,0 mL. A determinação da concentração de AmB no meio receptor foi realizada em espectrofotômetro UV-visível a 328 nm. Esse processo foi continuado até a liberação máxima ou até que a concentração de AmB ficasse constante no meio. Os experimentos de liberação foram realizados em triplicata e utilizando biogel sem a incorporação de AmB como formulação controle.

2.12. Formação de filmes de Biogel

Para a realização deste ensaio, películas de biogel foram produzidas como sugerido por Braga et al., (2018, 2019) e (Oliveira (2017) com adaptações, através da sua solubilização em água destilada à concentração de 150% (m/v) para BEU e 80% para BES. Após 10 minutos de agitação em misturador a temperatura ambiente, a solução foi depositada em uma base de vidro

com dimensões aproximadas de 31x21 cm. Em seguida, a película foi seca em condições ambientais e retirada manualmente da base de vidro.

3 Resultados e Discussão

3.1. Determinação do Ponto de Carga Zero (PCZ)

O ponto de carga zero (PCZ) indica o valor do pH que a superfície do material é neutra, ou seja, o pH é constante. A metodologia empregada para a determinação do PCZ é a do “experimento dos 11 pontos”, onde se usa pH variando de 1,0 a 12 de modo que a adsorção do cátion é favorecida quando o pH da solução é maior que o PCZ, enquanto que a adsorção de ânions é favorecida quando pH é menor que o PCZ.

A Figura 30 representa os valores de pHPCZ de BEU. Neste material, foi obtido um valor igual a 7,5, o que representa que a superfície do biogel é neutra em pH 7,5. Acima deste pH, a superfície é carregada negativamente e abaixo deste pH, é carregada positivamente. Sharma e colaboradores (2017) sintetizaram um Hidrogel nanocompósito de goma de guar com reticulação de pectina/ óxido de ferro superparamagnético para remoção de contaminantes orgânicos e encontraram um pHPCZ de 3 para este material.

A partir desses valores, foram determinadas as faixas de pH para a simulação de liberação controlada de diclofenaco sódico, cujo pka é 4,15

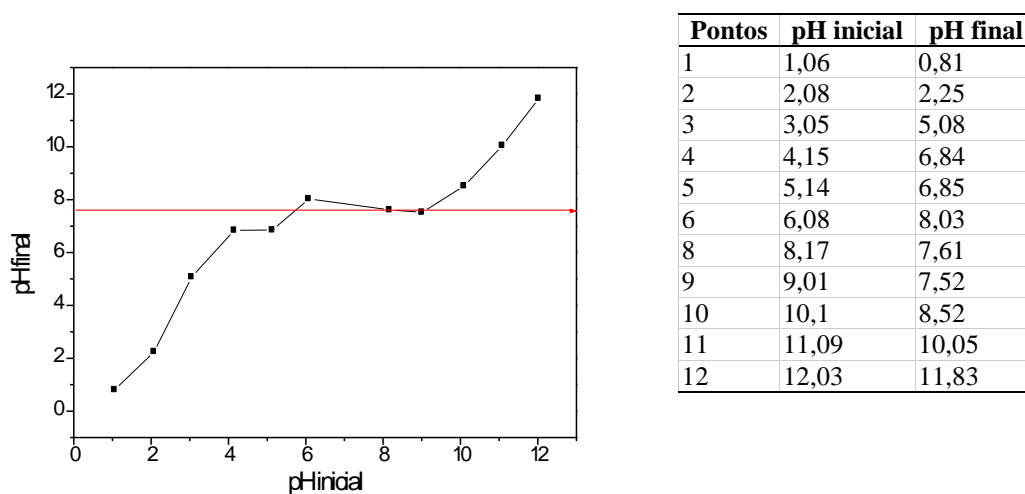


Figura 30. Determinação do ponto de carga zero do Biogel purificado por via úmida utilizado na formulação para liberação controlada. **Fonte:** o autor

3.2. Simulação de absorção de fluidos biológicos- suco gástrico

O estomago humano pode variar as condições de pH, chegando a 1, em condições mais extremas até pH 3. Diante disso, a fim de avaliar o comportamento do biogel nestas diferentes situações de variação de pH, os testes de absorção de fluidos foi simulado utilizando os pHs 1, 2 e 3, como pode ser visualizado na Tabela 15.

Tabela 15. Teste de Intumescimento dos biogéis em diferentes condições de pH do estomago humano

	Q (g/g)	
	BEU	BES
pH 1	36,36	33,13
pH 2	32,38	34,22
pH 3	36,37	36,13

Quando um hidrogel é colocado em contato com um solvente, as cadeias poliméricas podem sofrer interações com o meio. Este fenômeno culmina na expansão destas cadeias, aumentando a distância entre seus retículos e, conseqüentemente, no seu aumento de volume. O estágio de equilíbrio deste hidrogel é alcançado quando as forças osmóticas, ou seja, força que conduz o solvente para o interior do gel, e elástica retrativa, gerada pela mudança conformacional das cadeias poliméricas, se contrabalanceiam (FLORY e REHNER, 1943). Entretanto, os hidrogéis podem responder a mudanças no pH, temperatura, sal, luz, etc. em um curto espaço de tempo como resultado da funcionalidade de monômeros em sua estrutura. Essa alteração está relacionada ao equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico na estrutura da rede (MAHINROOSTA et al., 2018).

O pH pode variar o volume do hidrogel sempre que o mesmo possua grupos funcionais ionizáveis. Se estes grupos são carboxílicos, o aumento do pH provoca um aumento da hidrofiliabilidade da rede e, por conseguinte, o intumescimento (hidrogéis aniônicos). Mas se o polímero contém grupos aminas, este efeito é provocado pela diminuição do pH (hidrogéis aniônicos) (ARREDONDO-PEÑARANDA; LONDOÑO-LÓPEZ, 2014; ZHANG; PEPPAS, 2000). No caso estudado, os materiais apresentaram retração do grau de intumescimento, não apresentando grande variação entre os pHs 1, 2 e 3 e nem entre os produtos (BEU e BES). Mesmo assim, apresenta absorção de solução ácida de quase 40 vezes o seu peso, representando um candidato com grande potencial para aplicação em cápsulas ou dispositivos de controle de

obesidade. Os resultados obtidos através deste teste, indicam ainda que os biogéis são materiais sensíveis a variações de pH, corroborando os resultados vistos na determinação de PHPCZ, onde foi obtido um valor igual a 7,5. Em pH estomacal, a superfície dos produtos estão carregadas positivamente.

Os hidrogéis sensíveis ao pH tipicamente compreendem uma rede com grupos básicos e ácidos ionizáveis ligados à cadeia polimérica que pode protonar ou liberar prótons por mudanças no pH do ambiente. O inchaço e o ressecamento do hidrogel devido a alterações de pH são reversíveis: em altos valores de pH, os grupos ácidos em hidrogel aniônico perdem prótons e em pH baixo, os grupos básicos adquirem prótons. Quando o pH do solvente é alterado, é gerado um gradiente de concentração iônica entre o interior e o exterior do gel. Este gradiente causa a penetração de íons móveis dentro e fora da matriz polimérica e, mais importante, a pressão osmótica na superfície do hidrogel. A pressão osmótica resulta em mudança de volume desejável. O inchaço de hidrogel induz forças restauradoras elásticas na rede de polímeros que finalmente equilibram a pressão osmótica, levando ao equilíbrio no gel. O grau de inchaço/velocidade depende da pressão osmótica gerada (FIRESTONE; SIEGEL, 1991; MAHINROOSTA et al., 2018).

Este fator pode ainda ser favorável no encapsulamento de outros fármacos administrados por via oral, onde o biogel sofre retração das suas cadeias e consequente liberação do fármaco para o meio.

3.3. Esterificação para absorção de óleo

A reação de esterificação (acetilação) refere-se a uma reação simples, na qual o anidrido acético reage com os grupos hidroxílicos do material, gerando o ácido acético como subproduto. Para confirmar a ocorrência dessa reação, usou-se o parâmetro de ganho de massa (WPG), cujas amostras são analisadas gravimetricamente e o resultado é expresso em porcentagem. Os resultados de ganho de massa do biogel acetilado foi de 14,6%, confirmando, assim, a efetivação da esterificação devido ao acréscimo de massa. Essa verificação é possível porque grupos de menor massa, como o OH, são trocados pelos grupos acetil, aumentando assim a massa do produto final.

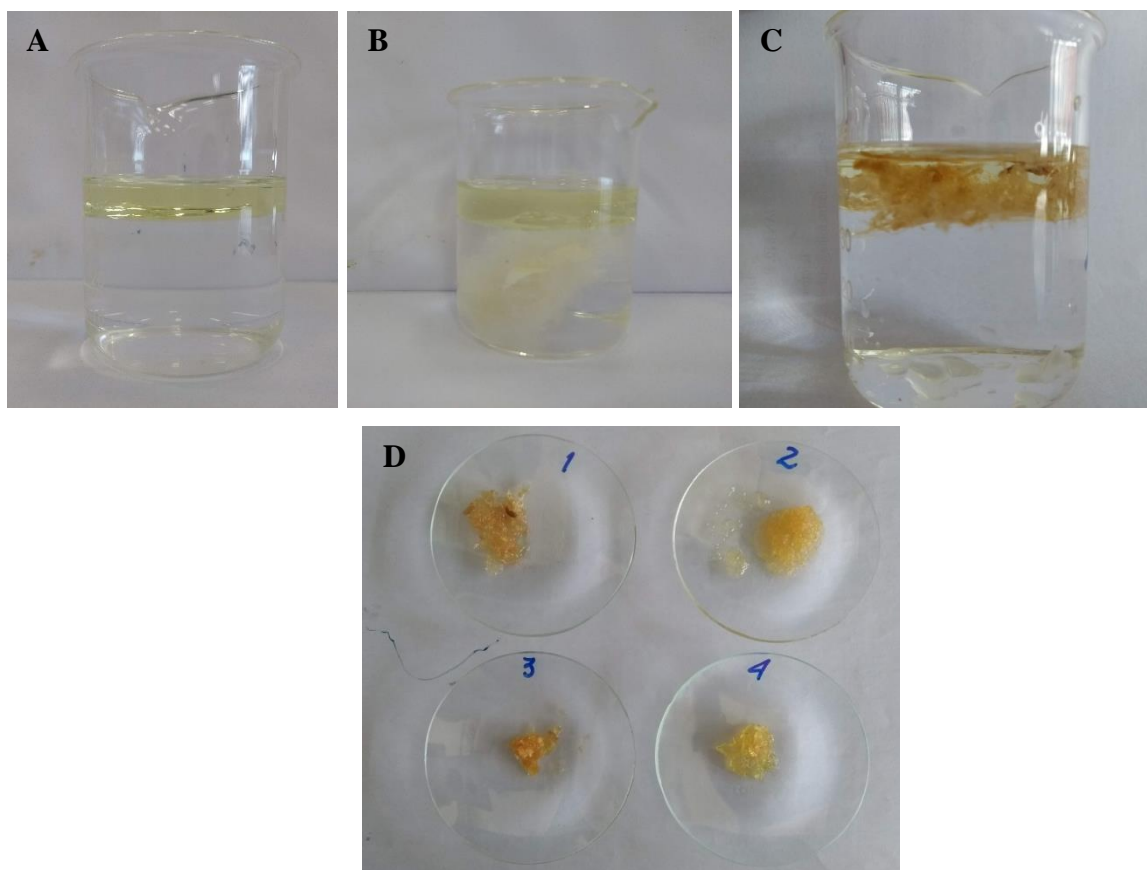


Figura 31. Teste de absorção de óleo: (A) solução gástrica; (B) biogel não acetilado em fase aquosa indicando sua hidrofiliicidade (C) biogel acetilado em fase oleosa indicando sua hidrofobicidade e intumescido em óleo após a realização do teste (D). **Fonte:** o autor

Os materiais foram testados ainda quanto a sua capacidade de absorver óleo vegetal (óleo de soja) misturado ao suco gástrico (Figura 31). Para isso, foi montado um sistema simulando o sistema digestivo humano e aproximadamente 0,1 gramas do material produzido. Os resultados do teste de absorção foram realizados em triplicata com as mesmas amostras do teste ganho de massa, sendo eles: 23,08; 20,08 e 22,13 g de óleo/g de material, confirmando a boa capacidade de absorção de óleo pelo biogel esterificado. Tal resultado traz à tona algumas possíveis aplicações que envolvem a captura de óleo e/ou gordura, tais como sua potencialidade como dispositivo de controle de peso. Apesar do produto disponível no mercado destinado a este fim não divulgar sua capacidade de absorção de óleo e gordura (QuitoPlan© - LHP Brasil), o resultado obtido com o biogel pode ser comparado a outros estudos de esterificação de biomassa para fins alimentícios tal como o realizado por Brum et al., (2012) e Karla, et al (2012), o qual obteve absorção máxima de óleo de soja de 1,7 g/g. Diante disso, o biogel esterificado ganha ainda mais notoriedade neste nicho industrial, podendo vir a se tornar um concorrente em potencial para os produtos semelhantes disponíveis no mercado.

3.4. Simulação da Digestão

Modelos de digestão *in vitro* recentemente ganharam muita atenção como uma ferramenta para entender os processos físico-químicos básicos que ocorrem durante a digestão e a liberação de compostos encapsulados (BOURBON et al., 2018). A simulação de digestão foi realizada a partir de metodologia adaptada de Heshmati et al., (2011) e Peixoto (2016) a qual mimetiza, *in vitro* a digestão humana. Para isso, foram fabricados comprimidos do biogel purificado e obtido por via úmida (BEU) com uma massa de 0,3g nas dimensões de 0,5 cm (Figura 32A). O teste foi, portanto, realizado considerando somente a fase gástrica da digestão.

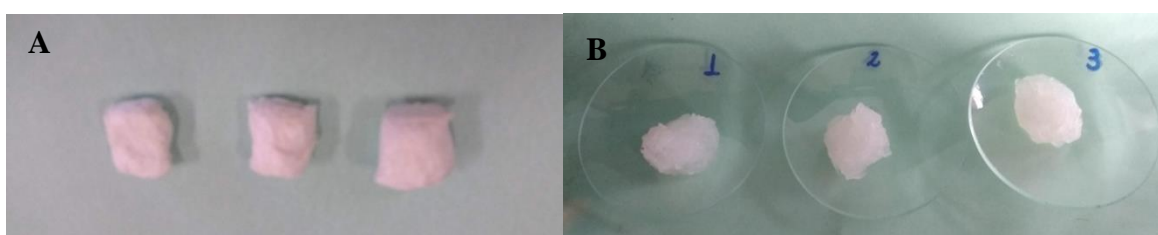


Figura 32. Comprimidos de Biogel antes (A) e após (B) teste de simulação de digestão demonstrando sua alta taxa de absorção de fluidos gástricos e baixa solubilidade no meio. **Fonte:** o autor

Após o período de digestão, os resíduos foram retirados da solução gástrica e pesados resultando num intumescimento médio de 28,48 g/g (Tabela 16). Como pode ser observado na Figura 32B, os géis se mantiveram insolúveis no meio ácido, apresentando somente dilatação de suas cadeias poliméricas e consequente aumento de volume.

Tabela 16. Intumescimento em solução de digestão e temperatura corporal

	Intumescimento (g/g)
BEU 1	28,76
BEU 2	27,64
BEU 3	29,04

Produtos de características semelhantes estão no mercado, como a marca Gelesis, a qual obteve no mês de abril de 2019, licença da FDA (*Food and Drug Administration*) para comercializar nos Estados Unidos um produto inovador nesta área. O produto, Plenity©, é composto de uma mistura de celulose com ácido cítrico e capaz de absorver até 100 vezes seu próprio peso. Sua dose diária é de 3 cápsulas que devem ser administradas antes das principais

refeições, mas não há relatos da sua quantidade de ativo por cápsula. Comparativamente, o comprimido de biogel com a quantidade manipulada e utilizando desta mesma dosagem (3 unidades), fica próximo ao descrito pelo fabricante do Plenity®. (GELESIS, 2019)

Ainda em um outro estudo do mesmo fabricante, mas com o produto Gelesis 100, foi indicado a cada paciente a dose de 2,25 g do juntamente com 500 mL de água 30 minutos antes da refeição. Segundo este estudo, o hidrogel contido no produto ocupa cerca de um quarto do volume médio do estômago e cria milhares de pequenos pedaços individuais de gel com elasticidade similar à de alimentos sólidos como vegetais, por exemplo, sem valor calórico. Além disso, mantém sua estrutura tridimensional e propriedades mecânicas durante o trânsito pelo intestino delgado (DEMITRI et al., 2017; GREENWAY et al., 2019). Tais características se assemelham aos resultados obtidos pelo biogel com a vantagem de utilização de uma quantidade inferior de material (0,9 g fracionadas em 3 comprimidos).

Diante o exposto, a utilização do biogel obtido e purificado de *Magonia pubecens* como dispositivo para controle de peso e redução de obesidade se torna muito atrativo, haja vista o produto apresentar características semelhantes ao dispositivo médico recentemente lançados no mercado. Além disso, o produto testado é livre de reticulação química, significando uma etapa a menos de produção e, conseqüentemente, tornando o custo menor. Deve-se considerar ainda que o biogel pode ser considerado menos quimicamente processado que o produto fornecido pela Gelesis, já que este é um hidrogel a base de celulose e reticulado com ácido cítrico. Outra vantagem é a fonte de obtenção da matéria-prima, que coloca em voga a utilização de espécies do Cerrado brasileiro para fins médicos, impulsionando a pesquisa e preservação de espécies locais.

3.5. Teste de estabilidade acelerada e Ensaio analítico organoléptico e físico-químico

O teste de estabilidade é realizado em produtos químicos e cosméticos com a finalidade de fornecer informações acerca da variação de suas características físico-químicas ao longo do tempo, sob influência de fatores ambientais tais como temperatura, umidade, microrganismos e luz. Sabendo disso, é possível se determinar um prazo de validade para os produtos, que é definido como o tempo, desde sua fabricação até a ocorrência de mudanças das características iniciais. Além disso, a partir da resposta desse teste, pode-se ainda recomendar condições de armazenamento adequadas e fornecer subsídios para o aperfeiçoamento das

formulações, garantindo assim a qualidade do produto e a segurança do usuário (HENRIQUES et al., 2004; ORIQUI; MORI; WONGTSCHOWSKI, 2013).

Em linhas gerais, os testes de estabilidade são experimentos conduzidos em condições próximas às condições reais de armazenamento e climáticas, visando fornecer informações sobre a estabilidade do produto em menos tempo possível. Entretanto, deve-se considerar estes parâmetros de modo que não sejam tão extremos que, em vez de acelerarem o envelhecimento, provoquem alterações que não ocorreriam no mercado (HENRIQUES et al., 2004). São, por isso, comumente chamados de teste de prateleira.

Para os biogéis, foram testadas duas condições de temperatura: 5 °C, armazenado em geladeira, e a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Não foram testadas as formulações com Diclofenaco sódico ou Anfotericina-B pois, como sugere o Guia de Estabilidade de produtos cosméticos da ANVISA (2004) e o Guia para a determinação da estabilidade de produtos químicos (2013), o teste foi iniciado em escala de desenvolvimento do novo produto, sendo também considerado como matéria-prima. Os géis foram então intumescidos ao máximo e armazenados em frascos de vidro tampados, respeitando o limite de aproximadamente um terço da capacidade do frasco para possíveis trocas gasosas. A frequência adotada foi de 24h, 7, 15, 30, 60 e 90 dias, como sugerido também pelos guias consultados. O resultado dos testes com os Biogéis Purificados Extraídos por via Úmida e Seca (BEU e BES, respectivamente) se encontram expressos na Tabela 17 e 18.

Segundo os critérios adotados pelo Guia Q1A(R2), do *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* – (ICH, 2003), os testes de estabilidade acelerada devem ser realizados por um período mínimo de 6 meses a menos que mudanças significativas ocorram em um intervalo anterior a 3 meses. Neste caso, deve-se fazer uma análise sobre os possíveis efeitos da exposição do produto por períodos de curto prazo fora das condições recomendadas de armazenamento e repetir o teste em períodos menores de tempo.

Tabela 17. Estudo de estabilidade dos comprimidos de biogel obtido por via umida após purificação

Estabilidade em temperatura ambiente						
Parâmetro	1° dia	7° dia	15° dia	30° dia	60° dia	90° dia
Cor	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Formação de fungos	Formação de fungos
Odor	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Modificada	Intensamente modificada - Enxofre
Aspecto	Gel	Gel	Gel	Gel	Gel	Gel
pH	6,0	6,0	5,91	5,94	5,47	5,46
Densidade	1,028	1,038	1,007	1,030	1,037	1,030
Estabilidade em Geladeira (5 °C)						
Parâmetros	1° dia	7° dia	15° dia	30° dia	60° dia	90° dia
Cor	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
Odor	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Intensamente modificada - Enxofre
Aspecto	Gel	Gel	Gel	Gel	Gel	Gel
pH	6,0	5,6	5,91	6,04	6,40	6,38
Densidade	1,028	1,029	1,039	1,027	1,030	1,030

Tabela 18. Estudo de estabilidade dos comprimidos de biogel obtido por via seca após purificação

Estabilidade em temperatura ambiente						
Parâmetro	1° dia	7° dia	15° dia	30° dia	60° dia	90° dia
Cor	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Amarelado
Odor	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Intensamente modificada - Enxofre
Aspecto	Gel	Gel	Gel	Gel	Gel	Gel
pH	6,10	6,0	6,3	6,40	6,38	6,40
Densidade	1,018	1,011	1,020	1,020	1,017	1,020
Estabilidade em Geladeira (5 °C)						
Parâmetros	1° dia	7° dia	15° dia	30° dia	60° dia	90° dia
Cor	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco
Odor	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Intensamente modificada - Enxofre
Aspecto	Gel	Gel	Gel	Gel	Gel	Gel
pH	6,10	6,30	6,20	6,25	6,30	6,3
Densidade	1,018	1,019	1,011	1,020	1,020	1,020

Ambos os géis testados apresentaram alterações significativas de suas características iniciais. A formação de fungos é ainda indicativo de contaminação microbiológica bem como o desenvolvimento de odor de enxofre, característico de fermentação anaeróbia. A coloração amarelada, no entanto, sugere o início da decomposição do produto. Nota-se ainda, que a maior incidência dessas alterações foi no produto obtido por via úmida e mantido sem refrigeração. Devido a sua composição ser majoritariamente de glicose e outros carboidratos não estruturais, estes produtos ficam mais suscetíveis ao ataque de microrganismos. A alta degradabilidade de produtos tendo como matéria-prima o hidrogel de *Magônia pubecens* foi reportada por Vilela (2017), o que é um indicativo de que os produtos destinados a outras aplicações necessitam de um agente inibidor de decomposição/degradação.

Os parâmetros que se mostraram menos sensíveis foram densidade e aspecto, sendo fatores positivos pois, apesar do evidente início de decomposição, os biogéis não perderam a característica de gel, como ocorre, por exemplo, durante a reticulação química de BEU.

3.6. Teste de Biotoxicidade- *Artemia Salina*

Meyer e colaboradores (1982) estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL_{50} , apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*. Desde então, considera-se que quando são verificados valores acima 1000 $\mu\text{g/mL}$, os elementos testados, são considerados atóxicos. *Artemia Salina* é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca, utilizada neste trabalho como bioindicador de toxicidade. Alguns resultados do teste de toxicidade utilizando *Artemia salina* nos Biogéis são expressos de acordo com a Tabela 19.

Tabela 19. Percentual de *Artemia* mortas em diferentes concentrações da amostra depois de 8 e 24h de exposição.

Concentração (ppm)	8h			24h		
	BES	BEU	BMES	BES	BEU	BMES
0	2,5	55	2,5	2,5	45,0	2,5
250	2,5	55	2,5	12,5	42,5	7,5
500	2,5	12,5	2,5	12,5	50,0	5,0
1250	5,0	12,5	0	12,5	55,0	0
2500	2,5	17,5	17,5	20,0	52,5	27,5
5000	7,5	27,5	27,5	27,5	65,0	52,5

A toxicidade nesse teste é determinada pela Dose Letal Mediana (DL_{50}) que é a dose necessária de uma dada substância para matar 50% de uma população em teste. Calcula-se a DL_{50} através da regressão linear dos dados da Tabela 19, sendo os resultados obtidos para 8 e 24h demonstrados na Tabela 20.

Tabela 20. Dose Letal Mediana (DL_{50}) dos biogéis BEU, BES e BMES testados com *Artemia salina*

Biogel	DL_{50} (ppm)	
	8h	24h
BEU	9.093	1.140
BES	5.302	10.242
BMES	9.043	4.940

Os biogéis testados não apresentaram toxicidade frente a *Artemia salina*, uma vez que a $DL_{50} > 1000$ ppm. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), são consideradas tóxicas substâncias que apresentam valores de DL_{50} abaixo de 1000 ppm em *Artemia salina*.

3.7. Análises Texturais - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises texturais foram realizadas na formulação de BMES e diclofenaco sódico 50 mg/g após liofilização e podem ser observadas da Figura 33. A partir das micrografias eletrônicas de varredura, foi possível verificar que a interação entre os cristais do fármaco e o biogel acontecem majoritariamente de forma superficial, não sendo possível afirmar que haja absorção do fármaco através dos poros do biogel.

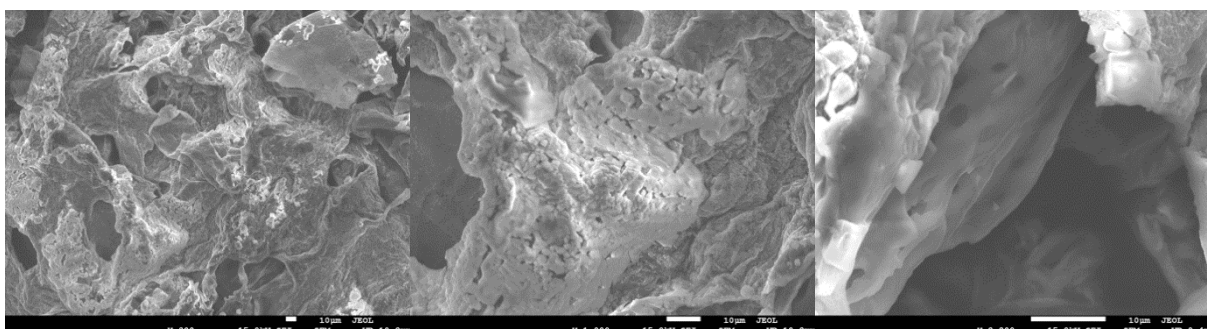


Figura 33. Micrografia Eletrônica do BMES com incorporação de Diclofenaco sódico. **Fonte:** o autor

3.8. Simulação de liberação em uso tópico

Para se estabelecer a quantidade de biogel a ser utilizada em cada formulação, foi realizado um teste de intumescimento utilizando as soluções dos fármacos. Para AmB, a solução utilizada teve concentração de 1,0 mg/mL que atingiu um Q máximo de 140,0 g/g. Para cada célula de teste de liberação *in vitro*, portanto, foi utilizado 7,0 mg de biogel seco e intumescido com 1,0 ml de solução AnB@C-Dots. A solução de DS utilizada teve concentração de 4,0 mg/mL e o biogel alcançou intumescimento máximo de 52,0 g/g. A formulação de DS teve portanto 48,0 mg de biogel seco, recebendo em cada célula de liberação uma concentração em massa de 10,0 mg de DS. As formulações de DS e AnB@C-Dots podem ser visualizadas na Figura 34.

A redução no grau de intumescimento em relação a água destilada em temperatura ambiente pode ser explicada pela diminuição dos espaços dentro dos poros do hidrogel além da interrupção das ligações de hidrogênio mediada pelas moléculas de Diclofenaco. O inchaço pode ser visto como um mecanismo de dissolução que promove o impulso osmótico do fármaco encapsulado do hidrogel para o meio de liberação (EGBU et al., 2018).

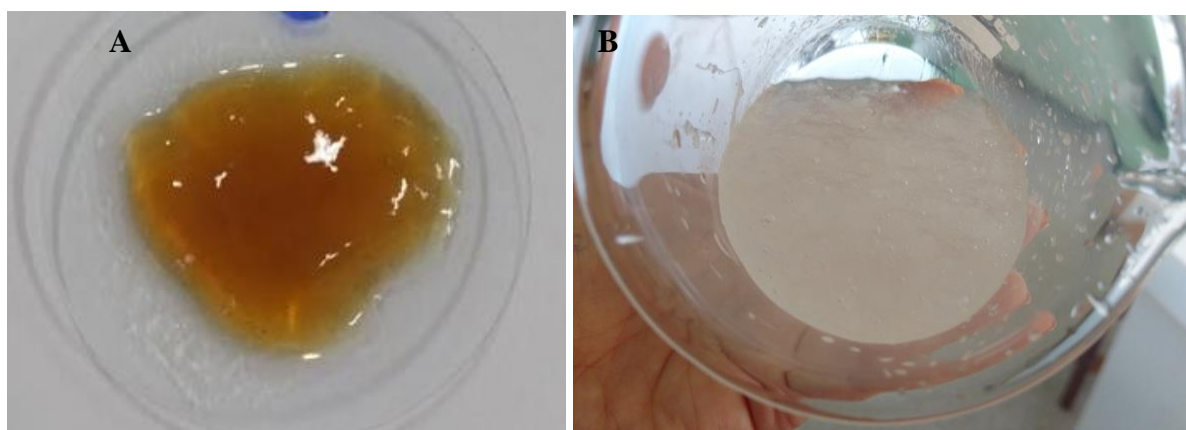


Figura 34. Formulações utilizando BEU e BMES como veículo: (A)- Anfotericina-B 1 mg + BEU e (B)- Diclofenaco Sódico 10mg + BMES. **Fonte:** o autor

3.9. Liberação de Anfotericina-B

A anfotericina-B (AmB) é um antifúngico polieno-macrolídrico usado para infecções invasivas causadas por *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, e também é um fármaco de segunda linha para o tratamento de doenças clínicas causadas pelo parasita *Leishmania spp* (SALERNO et al., 2013). Entretanto, apesar de ser um agente fungicida de amplo espectro com

pouca resistência intrínseca ou adquirida, ainda é limitada por suas graves toxicidades (PETRIKKOS, 2009). As formulações disponíveis no mercado ainda são administradas em pacientes sob a forma infusão parenteral, aumentando a exposição dos pacientes a nefrotoxicidade. (HAMILL, 2013). Opções que utilizem uma forma farmacêutica menos agressiva e com a mesma eficiência e eficácia são o foco dos pesquisadores.

Em uma compilação de estudos sobre o tratamento da leishmaniose cutânea e mucosa com anfotericina-B lipossomal realizada por Mosimann e colaboradores (2018), revelou que a AmB lipossomal alcançou taxas de cura de em 85% dos pacientes pesquisados com um regime de tratamento definido como 0,5 a 5,0 mg/kg/dia num único ciclo de tratamento. O tratamento tópico para este caso pode ser uma alternativa a aplicação intramuscular no caso do tratamento das lesões causadas pela leishmaniose cutânea.

No ensaio de liberação *in vitro*, foi então verificado que a formulação hidrogel@AnB@C-Dots liberou para o meio (tampão) de 67 a 70% da AnB@C-Dots encapsulada no biogel. Não foi encontrado na literatura ensaio semelhante, sendo este, portanto, um estudo pioneiro. Considerando que a dosagem mínima utilizada é de 1,0 mg/kg/dia e a faixa de liberação compreendida entre 67 e 70%, para esta formulação utilizando o biogel como veículo para a entrega do fármaco, a quantidade desta formulação a ser utilizada poderá ser de 1,43 mL a 1,5 mL, considerando a densidade da formulação hidrogel@AnB@C-Dots igual a da solução AnB@C-Dots.

Os resultados do ensaio de liberação *in vitro* podem ser visualizados na Figura 35, onde podemos ainda visualizar que a liberação máxima acontece ainda na primeira hora, com variação da concentração no meio ao longo do tempo. Essa variação, contudo, pode estar relacionada a interação da solução AnB@C-Dots e a superfície do biogel.

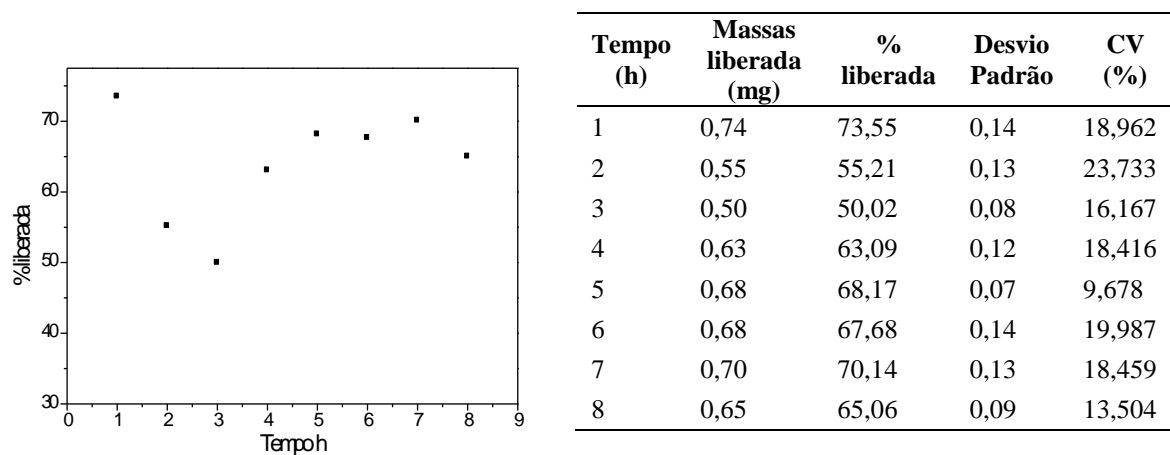


Figura 35. Perfil da liberação de AmB utilizando biogel como veículo: concentração máxima no meio de 67 a 70% da Anfotericina incorporada a matriz do biogel. **Fonte:** o autor

3.10. Liberação Diclofenaco Sódico

Diclofenaco sódico pertence a classe dos anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs) e, como a maioria dos AINE, age principalmente inibindo a enzima ciclooxigenase, impedindo a síntese local de prostaglandinas. (MARTÍNEZ et al., 2004). É indicado para uso em condições dolorosas crônicas e agudas, inflamação pós-operatória e pós-traumática, aliviando a dor e diminuindo a reação inflamatória e o edema, sendo um dos anti-inflamatórios mais usados na prática clínica atualmente (MÜLLER et al., 2004). Entretanto, o uso indiscriminado desta substância pode causar reações adversas pelo uso em curto ou longo prazo tais como distúrbios gastrintestinais como náusea, vômito, diarreia, cólicas abdominais, dispepsia, flatulência, anorexia e irritação local; no Sistema Nervoso Central pode causar cefaleia, tontura e vertigem e no fígado tendendo a causar elevação dos níveis séricos das enzimas aminotransferases (LIMA et al., 2015).

A aplicação local visa, portanto, a diminuição dos efeitos colaterais do fármaco, promovendo uma alternativa de tratamento menos prejudicial principalmente ao trato digestivo e hepático do paciente. O objetivo do uso do biogel é utilizá-lo como um veículo de liberação do DS. Para isto, foram conduzidos ensaios de liberação simulando as características do corpo humano. A concentração de diclofenaco sódico para a formulação foi escolhida tomando-se

como referência a formulação comercial Diclofenaco Sódico Gel, do laboratório EMS, o qual utiliza 10 mg de ativo por grama de formulação.

Os ensaios de liberação de Diclofenaco Sódico com os biogéis foram conduzidos em três diferentes condições de pH: 5,0; 7,5 e 9,0. Através do ensaio de pHPCZ, nestas condições de pH, as cargas dos biogéis estariam positivas em tampão 5, neutras em tampão 7,5 e negativas em tampão pH 9,0; enquanto o DS estaria sempre desprotonado devido seu pka ser de 4,15. Observando o comportamento da concentração de DS no meio receptor (Figura 34), é possível concluir que a melhor condição de liberação se deu em pH 9,0 onde 91% do DS encapsulado foi liberado para o meio. Em pH 5,0 entretanto, essa quantidade não chegou a 50% no tempo final, indicando que havia uma interação mais forte entre o biogel e a molécula de Diclofenaco que impedia que este fosse liberado para o meio. Em tampão pH 7,5 o comportamento foi semelhante ao tampão pH 9,0 liberando uma quantidade de DS ligeiramente inferior, 88%.

Em relação ao tempo de liberação, as concentrações máximas de DS foram detectadas entre 45 e 60 minutos em todas as condições de pH, como pode ser verificado a seguir na Figura 36.

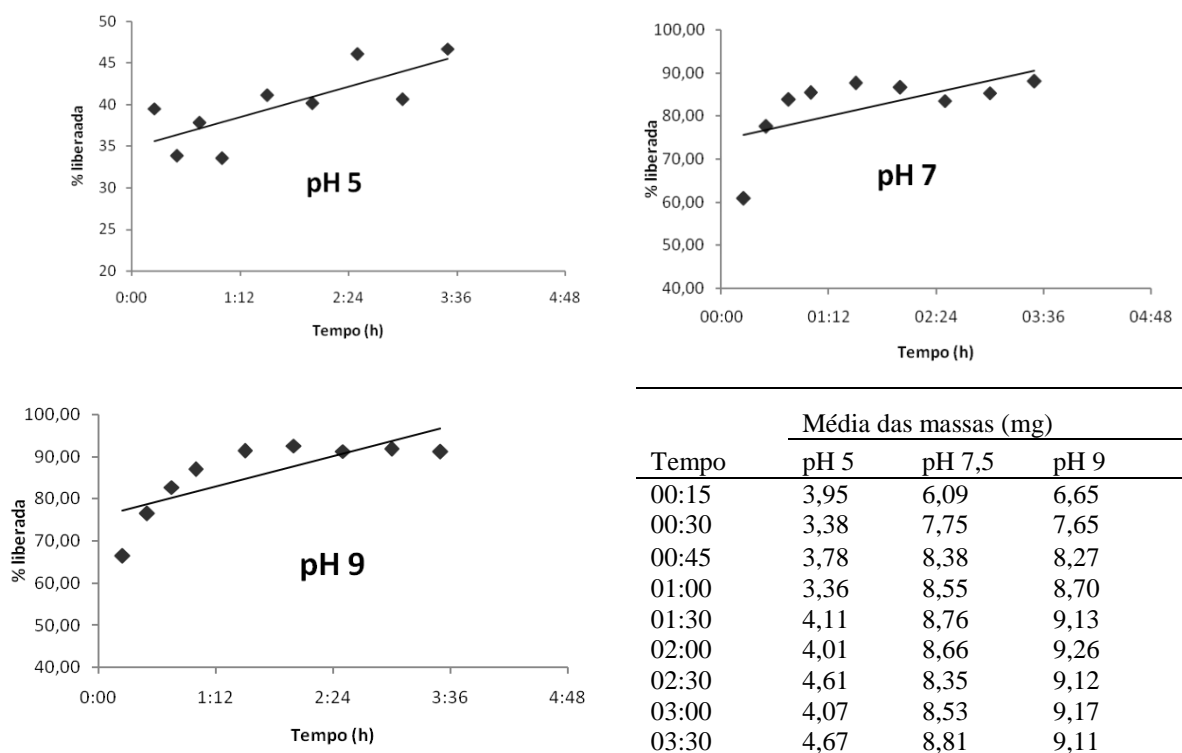


Figura 36. Liberação de DS em diferentes pHs ressaltando o comportamento de equilíbrio na concentração de fármaco no meio receptor

Estudando o comportamento da liberação *in situ* de DS através de microesferas de hidrogel de Quitosana, Qi e colaboradores (2016) conseguiram aproximadamente 90% de DS liberado após 48h de ensaio. Os perfis de liberação, entretanto, consistiram de uma liberação rápida nas primeiras 12 horas e sustentada após este período chegando a esta quantidade liberada após decorridas as 48h. O mesmo autor ainda avaliou a liberação com o hidrogel de Quitosana grafitizado com microesferas de alginato e atingiu a mesma quantidade liberada num período maior, 120h. Esta mudança no perfil da liberação foi então atribuído ao aumento de viscosidade do meio, devido ao acréscimo das microesferas de alginato, representando uma alternativa para os ensaios de liberação com os biogéis produzidos.

3.11. Formação de filmes de Biogel

Ambas as películas foram produzidas em superfície plana de vidro (método *casting*). Entretanto, as produzidas sem adição de plastificante não se soltaram facilmente da superfície, sendo necessário a hidratação parcial das mesmas para que esse processo fosse concluído. O resultado foi um filme quebradiço, rugoso e de difícil trabalhabilidade (Figura 37A). Outro método foi então empregado utilizando-se glicerina como agente plastificante e anti-aderente. A película resultante (Figura 37B) foi preparada com 4,0 g de Biogel purificado e extraído por via úmida com intumescimento máximo de 150 g/g e, ao final de 20 dias de secagem a temperatura ambiente, apresentou textura firme, aspecto homogêneo e desprendimento fácil, com gramatura de 0,0167 g/cm². Entretanto seu re-intumescimento foi significativamente menor, apresentando índice de 5,54 g/g, mas não muito diferente da película sem plastificante, que atingiu intumescimento de 6 g/g.

Ambas as películas apresentaram pontos de crescimento de fungos, desenvolvimento de odor característico de decomposição e escurecimento, necessitando, portanto, de um conservante em sua composição. A fim de não se perder as propriedades naturais do biogel, foram pensadas alternativas que apresentassem matérias-primas não sintéticas com atividade antifúngica e/ou bactericida/ bacteriostática. Uma alternativa foi a busca por óleos essenciais, entre eles, o óleo essencial de alecrim.

O Alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) é uma erva medicinal e aromática cujos compostos têm interesse global pelas suas diversas propriedades farmacológicas no campo

medicinal (ALI; CHUA; CHOW, 2019) e na indústria alimentar, sendo utilizado como aromatizante e conservante de alimentos devido ao seu potencial antioxidante e antimicrobiano (BORGES et al., 2019). Sabendo disso, foi associado a esta membrana óleo essencial de alecrim na concentração de 0,25 mL por grama de gel seco, concentração mínima sugerida em trabalhos desenvolvidos por Neves (2019), a qual apresenta inibição no crescimento de microorganismos. Os resultados desta etapa, entretanto, ainda encontram-se em desenvolvimento pois, até o momento de entrega deste material, não haviam sido determinada uma concentração eficaz na inibição do crescimento de fungos nas películas de biogel.



Figura 37. Filme de Biogel purificado extraído por via úmida moldados via *casting*. Em A, sem plastificante e B com glicerina. Gramatura de 0,0167 g/cm²

4 Conclusão

Os estudos de aplicação que vem sendo executados com os biogéis demonstraram que os mesmos são candidatos em potencial para o desenvolvimento de vários produtos que utilizam como base agentes hidrofílicos. Apesar de ainda estarem em andamento vários ensaios, já é possível concluir que os biogéis não apresentam toxicidade aguda aparente, como sugerido pelo teste de toxidade realizado com *Artemia Salina*.

Quando testados como veículos para incorporação de fármacos, o biogel purificado extraído por via úmida permitiu que mais de 90% de Diclofenaco sódico fosse liberado em um período de 45 a 60 minutos quando o meio receptor estava em pH 9,0. Este resultado sugere que há pouca interação entre a molécula de fármaco e a superfície do biogel, corroborando ainda o demonstrado pelo teste de pH PCZ, o qual indica que a superfície do gel está negativamente carregada assim como o Diclofenaco, que possui pKa 4,15.

No ensaio de liberação utilizando Anfotericina-B modificada com C-Dots, foi verificado que a formulação hidrogel@AnB@C-Dots liberou para o meio de 67 a 70% da AnB@C-Dots encapsulada no biogel, indicando ainda ser um candidato para aplicações desta molécula topicamente, estudo alvo de pesquisas e depósito de patentes para o tratamento de doenças causadas por fungos de difícil controle e acesso além de leishmaniose.

Ainda quando intumescidos em diferentes condições de pH, os biogéis apresentaram a capacidade de absorver mais de 36 vezes seu próprio peso em suco gástrico sintético, além de apresentar pouca degradação durante o teste de digestibilidade, representando um material em potencial uso para desenvolvimento de cápsulas para o controle e redução de obesidade, atuando como inibidores de apetite ao intumescerem no estomago humano. Essas características são similares a produtos recentemente liberados para consumo pela agência reguladora dos Estados Unidos.

A formação de filmes foi outro resultado muito positivo e promissor na apresentação dos biogéis, resultando em um produto uniforme, transparente e de aspecto visual interessante, podendo ser aplicado de várias formas pela indústria médica, cosmética e/ou farmacêutica.

Dentre as tantas vantagens do uso dos biogéis desenvolvidos, destaca-se seu uso na promoção da saúde humana como um potencial substituto a vários materiais sintéticos existentes nesse mercado. Vários testes ainda estão em desenvolvimento a fim de corroborar os resultados obtidos até aqui, entretanto, os resultados já obtidos demonstram o variado leque de possibilidades de uso deste material na área da saúde, estética, nutrição, entre outros, sendo possível a produção de materiais renováveis de baixo custo visando a sustentabilidade.

Esses materiais, como demonstrado, são biodegradáveis e não poluentes, indo de encontro as necessidades do mercado pela busca de materiais ambientalmente amigáveis. Além disso, por ser obtido por extrativismo, colabora a geração de renda para a comunidade Kalunga, uma das comunidades nativas do Cerrado na região do estado de Goiás, a partir do desenvolvimento de atividades ligadas ao beneficiamento do Tingui. Além disso, incentiva a preservação do Cerrado brasileiro como fonte de recursos naturais para o desenvolvimento de novos materiais sustentáveis e de alto valor agregado.

REFERÊNCIAS

ABDOU, H. M. **Dissolution, Bioavailability and Bioequivalence**. Easton: Mack Publishing Compan, 1989.

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

AJOVALASIT, A. et al. Xyloglucan-based hydrogel films for wound dressing: Structure-property relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 262–272, 1 jan. 2018.

AL-KINANI, A. A. et al. Ophthalmic gels: Past, present and future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 126, p. 113–126, 27 dez. 2017.

ALI, A.; CHUA, B. L.; CHOW, Y. H. An insight into the extraction and fractionation technologies of the essential oils and bioactive compounds in *Rosmarinus officinalis* L.: Past, present and future. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 338–351, 1 set. 2019.

ALSHEHRI, S. M. et al. Development of carboxymethyl cellulose-based hydrogel and nanosilver composite as antimicrobial agents for UTI pathogens. **Carbohydrate Polymers**, v. 138, p. 229–236, 15 mar. 2016.

AMERICAN OPTOMETRIC ASSOCIATION. **Age-Related Macular Degeneration**. Disponível em: <<https://www.aoa.org/patients-and-public/eye-and-vision-problems/glossary-of-eye-and-vision-conditions/macular-degeneration?sso=y>>. Acesso em: 7 jun. 2018.

AOUADA, A. F.; MATTOSO, L. H. C. Hidrogéis Biodegradáveis: uma opção na aplicação como veículos carreadores de sistemas de liberação controlada de pesticidas. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, v. 28, p. 32, 2009.

ARREDONDO-PEÑARANDA, A.; LONDOÑO-LÓPEZ, M. E. Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. **Revista Ingeniería Biomédica**, v. 3, p. 83–94, 2014.

ASHORI, A. et al. Solvent-free acetylation of cellulose nanofibers for improving compatibility and dispersion. v. 102, p. 369–375, 2014.

AZEREDO, H. M. C.; WALDRON, K. W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact—A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, 2016.

BAI, R. et al. Tearing a hydrogel of complex rheology. **Journal of the Mechanics and Physics of Solids**, 2019.

BAJPAI, A. K. et al. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 33, n. 11, p. 1088–1118, 2008.

BAJPAI, S. K. et al. Swelling behavior of cross-linked dextran hydrogels and preliminary Gliclazide release behavior. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 978–987, 2016.

BAJPAI, S. K.; CHAND, N.; MAHENDRA, M. In situ formation of silver nanoparticles in poly(methacrylic acid) hydrogel for antibacterial applications. **Polymer Engineering & Science**, v. 53, n. 8, p. 1751–1759, ago. 2013.

BAPTISTA, A. C.; BORGES, J. P.; FERREIRA, I. Ciência e tecnologia dos materiais. **Ciência & Tecnologia dos Materiais**, v. 22, n. 1–2, p. 2–13, 2010.

BASHIR, S. et al. Synthesis and characterization of karaya gum-g- poly (acrylic acid) hydrogels and in vitro release of hydrophobic quercetin. **Polymer**, v. 147, p. 108–120, jul. 2018.

BHUTANI, U. et al. Sodium alginate and gelatin hydrogels: Viscosity effect on hydrophobic drug release. **Materials Letters**, v. 164, p. 76–79, 1 fev. 2016.

BOLADO-RODRÍGUEZ, S. et al. Effect of thermal, acid, alkaline and alkaline-peroxide pretreatments on the biochemical methane potential and kinetics of the anaerobic digestion of wheat straw and sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 182–190, 1 fev. 2016.

BORGES, R. S. et al. Rosmarinus officinalis essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, p. 29–45, 30 jan. 2019.

BOURBON, A. I. et al. In vitro digestion of lactoferrin-glycomacropeptide

nanohydrogels incorporating bioactive compounds: Effect of a chitosan coating. **Food Hydrocolloids**, 2018.

BOWIL. **Bowil**. Disponível em: <<http://bowil.pl/en/products/celmat-wound/>>. Acesso em: 11 jun. 2018.

BRAGA, L. R. et al. Simple synthesis of active films based on PVC incorporated with silver nanoparticles: Evaluation of the thermal, structural and antimicrobial properties. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 15, p. 122–129, 1 mar. 2018.

BRAGA, L. R. et al. Evaluation of the antimicrobial, antioxidant and physicochemical properties of Poly(Vinyl chloride) films containing quercetin and silver nanoparticles. **LWT**, v. 101, p. 491–498, 1 mar. 2019.

BRASEQ BRASILEIRA DE EQUIPAMENTOS LTDA. **Viscosímetro rotacional brookfield - BrasEq**. Disponível em: <<https://www.braseq.com.br/viscosimetro-rotacional-brookfield>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

BRASIL. **Resolução - RDC nº 44**. Brasília: [s.n.].

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 199–204, 2009.

BRUM, S. S. Caracterização E Modificação Química De Resíduos Sólidos Do Beneficiamento Do Café Para Produção De Novos Materiais. p. 152, 2007.

BRUM, S. S. et al. Síntese de acetato de celulose a partir da palha de feijão utilizando N-bromossuccinimida (NBS) como catalisador. **Polímeros**, v. 22, n. ahead, p. 0–0, 2012.

CALÓ, E.; KHUTORYANSKIY, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**, v. 65, p. 252–267, 2015.

CANTERI, M. H. G.; WOSIACKI, L. M. G.; SCHEER, A. DE P. Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149–157, 2012.

CHANG, C.; ZHANG, L. Cellulose-based hydrogels: Present status and application prospects. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 40–53, 2011.

CHENG, Y.-H. et al. Thermosensitive chitosan-based hydrogel as a topical ocular drug delivery system of latanoprost for glaucoma treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 144, p. 390–399, 25 jun. 2016a.

CHENG, Y. et al. Improvement of direct liquefaction of technical alkaline lignin pretreated by alkaline hydrogen peroxide. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 122, p. 277–281, 1 nov. 2016b.

CHOE, D. et al. Synthesis of high-strength microcrystalline cellulose hydrogel by viscosity adjustment. **Carbohydrate Polymers**, v. 180, p. 231–237, 15 jan. 2018.

CHORILLI, M.; ZAGUE, V.; LEONARDI, G. R. Influência Da Viscosidade Do Veículo Na Liberação in. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IV, n. 1, p. 52–60, 2007.

DEMITRI, C. et al. **Satiety, Weight Loss, and Glycemic Control-Enhancing Properties Vary Between Functional Fibers, Mixed Vegetables, and a Novel Hydrogel (Gelesis200)**. Porto: [s.n.]. Disponível em: <https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/80400530/pdf/0506/usual_nutrient_intake_dietary_fiber_2003-06.pdf>.

EGBU, R. et al. Antibody loaded collapsible hyaluronic acid hydrogels for intraocular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 124, p. 95–103, 1 mar. 2018.

EL HALAL, S. L. M. et al. Films based on oxidized starch and cellulose from barley. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 644–653, 2015.

FAHN, A. **Plant anatomy**. 4. ed. London, UK: Pergamon Press, 1990.

FERREIRA, N. N. et al. Recent advances in smart hydrogels for biomedical applications: From self-assembly to functional approaches. **European Polymer Journal**, v. 99, p. 117–133, 1 fev. 2018.

FERRETTI, M. Princípios e aplicações de espectroscopia de fluorescência de Raios X

(FRX) com instrumentação portátil para estudo de bens culturais. **Revista CPC**, n. 7, p. 74–98, 2009.

FILHO, V. F. N. **TÉCNICAS ANALÍTICAS NUCLEARES DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO DE ENERGIA (ED-XRF) E POR REFLEXÃO TOTAL (TXRF)**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.fem.unicamp.br/~giorgia/fluorescencia.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2018.

FIRESTONE, B. A.; SIEGEL, R. A. Kinetics and mechanisms of water sorption in hydrophobic, ionizable copolymer gels. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 43, n. 5, p. 901–914, 1991.

GELEISIS. **Introducing Plenity**. Disponível em: <<https://www.myplenity.com/>>. Acesso em: 19 jul. 2019.

GIBAS, I.; JANIK, H. REVIEW : SYNTHETIC POLYMER HYDROGELS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS What are Hydrogels? History of Hydrogels. **Chemical Technology**, v. 4, n. 4, 2010.

GOH, J. Z. et al. Rapid spectrophotometric determination, characterization and anti-inflammatory efficacy evaluation of nanoencapsulated diclofenac sodium. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 361–366, 2014.

GONZALEZ, R. DA S. **Preparação , caracterização morfológica e aplicações de hidrogéis de P (N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico)**. [s.l.] Universidade de Campinas, 2008.

GORIN, P. A. J. et al. Characterization of carbohydrate components of an unusual hydrogel formed by seed coats of *Magonia pubescens* (Tingui). **Carbohydrate Research**, v. 282, n. 2, p. 325–333, 1996.

GOULD, J. M. Studies on the Mechanism of Alkali ne Peroxide Delignification of Agricultural Residues. 1984.

GOULD, J. M. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 3, p. 225–231, mar. 1985.

GREENWAY, F. L. et al. Obesity A Randomized , Double-Blind , Placebo-Controlled Study of Gelesis100 : A Novel Nonsystemic Oral Hydrogel for Weight Loss. **Obesity**, v. 27, n. 2, p. 205–2016, 2019.

GROSSI, E. C. **Produção de etanol de segunda geração a partir de um derivado de celulose** **Produção de etanol de segunda geração a partir de um derivado de celulose**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2015.

GUARIM NETO, GERMANO ; SANTANA, S. R. III Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal Os Desafios do Novo Milênio. **America**, p. 1–31, 2000.

GYLES, D. A. et al. A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations. **European Polymer Journal**, v. 88, n. 01, p. 373–392, 2017.

HAMILL, R. J. **Amphotericin B formulations: A comparative review of efficacy and toxicity** **Drugs**, 2013.

HENRIQUES, C. M. P. et al. **Séries Temáticas**. [s.l: s.n.]. v. 1

HESHMATI, H. M. et al. **Cereal Bars Containing SAEF ® , a Novel Superhydrating Fiber , Exhibit Significantly Greater Satiety-Enhancing Properties than Cereal Bars Containing Glucomannan in Simulated Stomach Model**. 29th Annual Scientific Meeting. **Anais...**2011

HOKKANEN, S.; REPO, E.; SILLANPÄÄ, M. Removal of heavy metals from aqueous solutions by succinic anhydride modified mercerized nanocellulose. **Chemical Engineering Journal**, v. 223, p. 40–47, 2013.

HU, W. et al. Solvent-free acetylation of bacterial cellulose under moderate conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1575–1581, 2011.

ICH. **INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE STABILITY**

TESTING OF NEW DRUG SUBSTANCES AND PRODUCTS Q1A(R2). [s.l: s.n.].

JENACELL. **JeNaCell**. Disponível em: <<http://www.jenacell.com/en/products/base-material>>. Acesso em: 11 jun. 2018.

JOHAR, N.; AHMAD, I.; DUFRESNE, A. Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. **Industrial Crops & Products**, v. 37, p. 93–99, 2011.

JOLY, C. A. . et al. Physiology of germination and seed gel analysis in two populations of *Magonia pubescens* St.Hil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 3, n. 1/2, p. 1–9, 1980.

KARLA, L. et al. **Desenvolvimento de materiais adsorventes de óleos a partir de resíduos do beneficiamento do café e sua aplicação na ração para aves Development of oil adsorbent materials from the processing coffee waste and its application in poultry feed****Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.rbspa.ufba.br>>. Acesso em: 28 maio. 2019.

KERSTEN, E. et al. Systemic and ocular fluid compounds as potential biomarkers in age-related macular degeneration. **Survey of Ophthalmology**, v. 63, n. 1, p. 9–39, 1 jan. 2018.

KIM, U.-J.; EOM, S. H.; WADA, M. Thermal decomposition of native cellulose: Influence on crystallite size. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 778–781, 2010.

KLEMM, D. et al. Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state. **Materials Today**, 26 abr. 2018.

KOEHLER, J.; BRANDL, F. P.; GOEPFERICH, A. M. Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds. **European Polymer Journal**, v. 100, p. 1–11, 1 mar. 2018.

KONO, H.; FUJITA, S. Biodegradable superabsorbent hydrogels derived from cellulose by esterification crosslinking with 1,2,3,4-butanetetracarboxylic dianhydride. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 4, p. 2582–2588, 2012.

KOUSER, R. et al. Biocompatible and mechanically robust nanocomposite hydrogels for potential applications in tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 84,

p. 168–179, 1 mar. 2018.

LAHOUD, H. M.; CAMPOS, R. Aspectos Teóricos Relacionados À Reologia Farmacêutica. **Visão Acadêmica Acadêmica**, v. 11, n. 1518–5192, p. 65–73, 2010.

LI, H. et al. Enhanced enzymatic hydrolysis and acetone-butanol-ethanol fermentation of sugarcane bagasse by combined diluted acid with oxidate ammonolysis pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 257–263, 2017a.

LI, P. et al. Preparation and characterization of chitosan physical hydrogels with enhanced mechanical and antibacterial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1383–1392, 10 fev. 2017b.

LI, X. et al. PHARMACEUTICAL NANOTECHNOLOGY: A Novel Composite Hydrogel Based on Chitosan and Inorganic Phosphate for Local Drug Delivery of Camptothecin Nanocolloids. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 1, p. 232–241, 1 jan. 2011.

LIAROU, E. et al. Smart polymersomes and hydrogels from polypeptide-based polymer systems through α -amino acid N-carboxyanhydride ring-opening polymerization. From chemistry to biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 83, p. 28–78, 1 ago. 2018.

LIMA, B. V. DE. **Avaliação das Propriedades físico-químicas de Sistemas à Base de Carboximetilcelulose e poli (N-isopropilacrilamida) em soluções aquosas para aplicação na Indústria do Petróleo.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2014.

LIMA, R. S. et al. Uso indiscriminado de diclofenaco de potássio pela população idosa na cidade de Anápolis, no estado de Goiás, Brasil em 2014. **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm**, v. 44, n. 2, p. 179–188, 2015.

LIU, S. et al. Three-dimensional hydrogel scaffolds facilitate in vitro self-renewal of human skin-derived precursors. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 7, p. 3177–3187, 2014.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.

2, p. 143–154, jun. 2005.

LORENZI, H. **ARVORES BRASILEIRAS: MANUAL DE IDENTIFICAÇÃO E CULTIVO DE PLANTAS ARBOREAS NATIVAS DO BRASIL**. 1° ed. [s.l.] Plantarum, 2009.

MA, R.; GUO, M.; ZHANG, X. Recent advances in oxidative valorization of lignin. **Catalysis Today**, v. 302, p. 50–60, 15 mar. 2018.

MA, R.; XU, Y.; ZHANG, X. Catalytic Oxidation of Biorefinery Lignin to Value-added Chemicals to Support Sustainable Biofuel Production. **ChemSusChem**, v. 8, n. 1, p. 24–51, jan. 2015.

MACEDO, M. C. DE et al. Biometria de frutos e sementes e germinação de *Magonia pubescens* ST.Hil (sapindaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 202–211, 2009a.

MACEDO, M. C. DE et al. Biometria de frutos e sementes e germinação de *Magonia pubescens* ST.Hil (sapindaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 202–211, 2009b.

MADHAV, M. R. et al. Toxicity and accumulation of Copper oxide (CuO) nanoparticles in different life stages of *Artemia salina*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 52, p. 227–238, 1 jun. 2017.

MAHDAVINIA, G. R. et al. Model protein BSA adsorption onto novel magnetic chitosan/PVA/laponite RD hydrogel nanocomposite beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 719–729, 1 fev. 2018.

MAHINROOSTA, M. et al. Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. **Materials Today Chemistry**, v. 8, p. 42–55, 1 jun. 2018.

MARTIN, A. N.; BUSTAMANTE, P. **Physical pharmacy: physical chemical principles in the pharmaceutical sciences**. [s.l.] Lea & Febiger, 1993.

MARTÍNEZ-PATIÑO, J. C. et al. Bioresource Technology Combined acid / alkaline-peroxide pretreatment of olive tree biomass for bioethanol production. v. 239, p. 326–335,

2017a.

MARTÍNEZ-PATIÑO, J. C. et al. Combined acid/alkaline-peroxide pretreatment of olive tree biomass for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 326–335, 1 set. 2017b.

MARTÍNEZ-PATIÑO, J. C. et al. Combined acid/alkaline-peroxide pretreatment of olive tree biomass for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 326–335, 1 set. 2017c.

MARTÍNEZ, V. E. et al. Medicina oral, patología oral y cirugía bucal. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Ed. impresa)**, v. 9, n. 5, p. 444–453, 2004.

MEYER, B. et al. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 05, p. 31–34, 1982.

MOSIMANN, V. et al. Liposomal amphotericin B treatment of Old World cutaneous and mucosal leishmaniasis: A literature review. **Acta Tropica**, v. 182, p. 246–250, 1 jun. 2018.

MUKHOPADHYAY, P. et al. PH sensitive N-succinyl chitosan grafted polyacrylamide hydrogel for oral insulin delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 627–637, 2014.

MÜLLER, S. S. et al. Análise clínica e biomecânica do efeito do diclofenaco sódico na consolidação da fratura da tíbia no rato. **ACTA ORTOP BRAS**, v. 12, n. 4, 2004.

NEPOVINNYKH, N. V. et al. Hydrogel based dessert of low calorie content. **Food Hydrocolloids**, 22 mar. 2018.

NETZ, P. **Fundamentos de físico-química : uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. [s.l.] Grupo A - Bookman, 2000.

NEWBERRY, C.; PIKETT-BLAKELY, O. Future Therapies in Obesity. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 45, n. 4, p. 705–714, 1 dez. 2016.

NGUYEN, Q. V. et al. Injectable polymeric hydrogels for the delivery of therapeutic agents: A review. **European Polymer Journal**, v. 72, p. 602–619, 2015.

OLIVEIRA, J. P. DE et al. Cellulose fibers extracted from rice and oat husks and their application in hydrogel. **Food Chemistry**, v. 221, p. 153–160, 2017a.

OLIVEIRA, J. P. DE et al. Cellulose fibers extracted from rice and oat husks and their application in hydrogel. **Food Chemistry**, v. 221, p. 153–160, 15 abr. 2017b.

OLIVEIRA, M. R. **Hemicelulose de Fibras de Curauá (Ananás Erectifolius): Obtenção e Caracterização de Películas Poliméricas**. [s.l.] Universidade de Brasília - UnB, 2017.

ORIQUEI, L. R.; MORI, M.; WONGTSCHOWSKI, P. Guia para a determinação da estabilidade de produtos químicos. **Química Nova**, 2013.

OVERDUIN, J. et al. NUTRALYS†pea protein: characterization of in vitro gastric digestion and in vivo gastrointestinal peptide responses relevant to satiety. **Food & Nutrition**, v. 59, 2015.

PAULA, J. E. DE; ALVES, J. L. DE H. **Madeiras nativas: anatomia, dendrologia, dendrometria, produção, uso**. Brasília: Fundação Mokiti Okada, 1997.

PEIXOTO, F. M. **Simulação de Digestão In Vitro Acoplada a Modelos de Transporte Gástrico e Intestinal para Estimar a Captação e Absorção de Antocianinas em Frutos**. [s.l.] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, 2016.

PETRIKKOS, G. L. Lipid formulations of amphotericin B as first-line treatment of zygomycosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 87–92, 1 jan. 2009.

QI, X. et al. Intra-articular Administration of Chitosan Thermosensitive In Situ Hydrogels Combined With Diclofenac Sodium-Loaded Alginate Microspheres. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 1, p. 122–130, 1 jan. 2016.

RABELO, S. C. et al. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, v. 136, p. 349–357, 15 nov. 2014.

RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 83–91, 2016.

RANGA RAO, K. V.; PADMALATHA DEVI, K. Swelling controlled-release systems: recent developments and applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 48, n. 1–3, p. 1–13, 1 dez. 1988.

RIBAS DE OLIVEIRA, C. M.; ALQUINI, Y.; GORIN, P. A. J. Microscopic and NMR analysis of the external coat from seeds of *Magonia pubescens*. **New Phytologist**, v. 152, n. 3, p. 501–509, 2001.

ROBLES ADVISOR, J. O.; REGALBUTO, J. R. The Engineering of Pt/Carbon Catalyst Preparation For application on Proton Exchange Fuel Cell Membrane (PEFCM). 2004.

ROCHA DOS SANTOS MATHIAS, T.; CARLOS SILVA ANDRADE CÍNTIA LETÍCIA DA SILVA ROSA BÁRBARA AMORIM SILVA, K. Avaliação do comportamento reológico de diferentes iogurtes comerciais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 1, p. 12–20, 2013.

SALERNO, C. et al. Lipid-based microtubes for topical delivery of Amphotericin B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 107, p. 160–166, 1 jul. 2013.

SALGADO-LABOURIAU, M. L. A semente de *Magonia pubescens* St. Hil: morfologia e germinação. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 45, n. 3/4, p. 501–537, 1973.

SANTOS MENEGUCCI, J. DOS et al. One-step synthesis of magnetic chitosan for controlled release of 5-hydroxytryptophan. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 380, p. 117–124, 2015.

SHARMA, G. et al. Pectin-crosslinked-guar gum/SPION nanocomposite hydrogel for adsorption of m-cresol and o-chlorophenol. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6, p. 96–106, 1 dez. 2017.

SHARMA, K. et al. Water retention and dye adsorption behavior of Gg-cl-poly(acrylic acid-aniline) based conductive hydrogels. **Geoderma**, v. 232–234, p. 45–55, 2014.

SHIMADZU. **Princípios e Recursos da espectrometria de fluorescência de raios-X**. Disponível em:

<http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/elemental/raios_x/eds/edx7000_8000-1.shtml>. Acesso em: 24 jun. 2018.

SHIMIZU, F. L. et al. Acid, alkali and peroxide pretreatments increase the cellulose accessibility and glucose yield of banana pseudostem. **Industrial Crops and Products**, v. 115, p. 62–68, 1 maio 2018.

SILVA, J. C. DA et al. Extraction, Addition and Characterization of Hemicelluloses from Corn Cobs to Development of Paper Properties. **Procedia Materials Science**, v. 8, p. 793–801, 1 jan. 2015.

SILVA JUNIOR, M. C. DA. **100 Árvores do Cerrado: Guia de Campo**. 1ª Edição ed. Brasília: LGE, 2006.

STRASSBURG, B. B. N. et al. Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 4, p. 0099, 23 mar. 2017.

SZYMAŃSKA, E.; WINNICKA, K. Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 1819–1846, 2015.

ULLAH, F. et al. Classification, processing and application of hydrogels: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 57, 2015.

VARAPRASAD, K. et al. A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 79, p. 958–971, 1 out. 2017.

VIEIRA, A. C. M. **Hidrogéis Superabsorventes de biomassa do Cerrado: Síntese e Caracterização**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2015.

VILELA, F. J. **Desenvolvimento de um Condicionador de Solos com valor agregado a partir da biomassa de *Magonia pubescens***. [s.l.] Universidade de Brasília, 2017.

VINÍCIUS, L. et al. Adsorption of Cu (II), Cd (II), and Pb (II) from aqueous single metal solutions by sugarcane bagasse and mercerized sugarcane bagasse chemically modified with succinic anhydride. v. 74, p. 922–929, 2008.

VITOR SALMORIA, G.; ALBERTO KANIS, L. **A sinterização seletiva a laser baseia-se na.** [s.l: s.n.].

XU, W. et al. A novel pH-responsive hydrogel based on natural polysaccharides for controlled release of protein drugs. **RSC Adv.**, v. 5, n. 5, p. 3157–3167, 2015.

YAO, S. et al. Extraction of hemicellulose by hot water to reduce adsorbable organic halogen formation in chlorine dioxide bleaching of bagasse pulp. **Industrial Crops and Products**, v. 96, p. 178–185, 2017.

YOSHIMURA, T.; MATSUO, K.; FUJIOKA, R. Novel biodegradable superabsorbent hydrogels derived from cotton cellulose and succinic anhydride: Synthesis and characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 99, n. 6, p. 3251–3256, 2006.

ZHANG, J.; PEPPAS, N. A. Synthesis and Characterization of pH- and Temperature-Sensitive Poly(methacrylic acid)/Poly(*N* -isopropylacrylamide) Interpenetrating Polymeric Networks. **Macromolecules**, v. 33, n. 1, p. 102–107, jan. 2000.

3107 4137- larisse/ thiago