

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FRANCIELLE LOPES

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS BASEADOS EM GOMA XANTANA
E QUITOSANA PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE VITAMINA B₁₂

PONTA GROSSA
2022

FRANCIELLE LOPES

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS BASEADOS EM GOMA XANTANA
E QUITOSANA PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE VITAMINA B₁₂

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Química no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Michele Karoline Lima Tenório

PONTA GROSSA
2022

L864 Lopes, Francielle
 Síntese e caracterização de hidrogéis baseados em goma xantana e
 quitosana para a liberação controlada de vitamina B₁₂ / Francielle Lopes. Ponta
 Grossa, 2022.
 110 f.

 Dissertação (Mestrado em Química - Área de Concentração: Química),
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.

 Orientador: Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana.

 Coorientadora: Profa. Dra. Michele Karoline Lima-Tenório.

 1. Hidrogel. 2. Goma xantana. 3. Quitosana. 4. Vitamina b12. 5. Liberação
 controlada. I. Viana, Adriano Gonçalves. II. Lima-Tenório, Michele Karoline. III.
 Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. IV.T.

CDD: 574.192

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa e à CAPES, que apoiam e incentivam a pesquisa e me permitiram a oportunidade de cursar o Mestrado em Química.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana e Prof^ª. Dr^ª Michele Karoline Lima Tenório, que me auxiliaram a desenvolver este projeto, sempre presentes para dedicar um tempo para discussões e o aparecimento de novas ideias que enriqueceram este trabalho. Também ao Prof. Dr. Ernandes Taveira Tenório Neto, que trouxe sugestões valiosas para o desenvolvimento do trabalho. À Prof^ª. Dr^ª Vanessa Egea dos Anjos, que gentilmente cedeu o uso da incubadora de seu grupo de pesquisa, essencial para ensaios experimentais para a finalização do projeto.

Gostaria de agradecer também à minha família, em especial minha mãe, Cláudia Daniele Piurkoski Lopes, meu pai, Luciano Lopes e meu namorado, Marlon Rodrigo Treder, por todo apoio emocional e incentivo que me deram não só na realização deste trabalho, mas em todos os aspectos e decisões de minha vida.

Ao grupo de pesquisa LEsCaM e todos seus integrantes, especialmente aos meus amigos Adrielle Reis, André Kerek e Eduardo Protachevich, que estiveram sempre presentes nas etapas deste trabalho, auxiliando não só na discussão e enriquecimento do trabalho, como também nas etapas experimentais e no dia a dia.

À banca examinadora, Prof^ª. Dr^ª. Juliana Regina Kloss e Prof^ª. Dr^ª. Suellen Aparecida Alves, que aceitaram prontamente o convite de avaliar o trabalho e trazer novas sugestões para enriquecê-lo.

RESUMO

Este trabalho contempla a síntese e caracterização de hidrogéis baseados em polissacarídeos naturais Goma Xantana (GX) e Quitosana (QTS). Previamente à síntese dos hidrogéis, os polissacarídeos nativos foram quimicamente modificados com metacrilato de glicidila (GMA) a fim de introduzir grupamentos vinílicos na estrutura da GX e QTS, visando viabilizar a reação de reticulação química com a N'N'-dimetilacrilamida (DMA), o que resulta na formação de hidrogéis químicos. A modificação química foi caracterizada por análise de espectroscopia de absorvância na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Para a síntese de hidrogéis químicos, utilizou-se diferentes proporções dos polissacarídeos e do espaçador DMA. Após a síntese dos hidrogéis, estudou-se o mecanismo de intumescimento em água destilada, selecionando-se assim as formulações GXA3, GXA4, GXA5, GXA6, QTSA3, QTSA4 e QTSA5 que apresentaram menor fragilidade e menor grau de reticulação para ensaios de intumescimento em soluções tampão 1,2 e 6,8, a fim de investigar se os materiais sintetizados apresentaram comportamento pH-responsivo. Observou-se que os hidrogéis baseados em GX com formulação GXA3 e GXA6 obtiveram maiores resultados de grau de intumescimento (GI) em solução de pH 6,8 (aproximadamente 13 g g⁻¹ e 15,3 g g⁻¹, respectivamente) que em pH 1,2 (GI de 10 g g⁻¹ e 13 g g⁻¹), devido a ionização dos grupamentos carboxila (-COO⁻) presentes na estrutura do polissacarídeo. Os hidrogéis baseados em QTS apresentaram comportamento inverso, obtendo maiores valores de GI em solução tampão de pH 1,2 (3,44 g g⁻¹ para QTSA4 e 3,49 g g⁻¹ para QTSA5) do que em pH 6,8 (2,98 g g⁻¹ e 2,80 g g⁻¹), já que apresenta grupamentos amina (-NH₂) em sua estrutura. Desta forma foi possível concluir que os hidrogéis produzidos apresentaram potencial para serem utilizados dispositivos de liberação de fármacos. Em virtude dos melhores resultados obtidos, os hidrogéis baseados em GX seguiram para ensaios de liberação controlada de vitamina B₁₂ (VB₁₂) em sistema gastrointestinal simulado. Desta forma, os hidrogéis de formulação GXA5 (50,0 mg de GXm e 0,20 mL de DMA) e GXA6 (50,0 mg de GXm e 0,25 mL de DMA) foram carregados com VB₁₂ mediante intumescimento em solução na concentração de 100 µg mL⁻¹ e, uma vez secos, os ensaios de liberação foram realizados por intumescimento em sistema tamponado nos pHs 1,2 e 6,8, com a determinação de VB₁₂ liberada em intervalos de tempo definidos, até um total de 10h. A partir dos ensaios, observou-se que o hidrogel de formulação GXA6 apresentou características favoráveis para a aplicação como veículo para liberação controlada de VB₁₂ no intestino, já que obteve maior porcentagem de liberação acumulativa em pH 6,8 (aproximadamente 17%) que em pH 1,2 (aproximadamente 13%) e uma liberação mais controlada em solução 6,8, de forma a liberar menores quantidades do fármaco por intervalo de tempo.

Palavras-chave: hidrogel, goma xantana, quitosana, vitamina B12, liberação controlada.

ABSTRACT

This work contemplates the synthesis and characterization of hydrogels based on natural polysaccharides Xanthan Gum (XG) and Chitosan (CTS). Prior to the synthesis of the hydrogels, the native polysaccharides were chemically modified with glycidyl methacrylate (GMA) to introduce vinyl groups in the structure of the XG and CTS, to enable the chemical crosslinking reaction with N,N'-dimethylacrylamide (DMA), which results in the formation of chemical hydrogels. The chemical modification was characterized by analysis of absorbance spectroscopy in the infrared region with Fourier transform (FTIR). For the synthesis of chemical hydrogels, different proportions of polysaccharides and the DMA spacer were used. After the synthesis of the hydrogels, the swelling mechanism in distilled water was studied, thus selecting the formulations XGA3, XGA4, XGA5, XGA6, CTSA3, CTSA4 and CTSA5, which showed lower fragility and lower degree of crosslinking for swelling tests in 1.2 and 6.8 buffer solutions, to investigate whether the synthesized materials showed pH-responsive behavior. It was observed that the hydrogels based on XG with the formulation XGA3 and XGA6 obtained higher results in the degree of swelling (SW) in a pH 6.8 solution (approximately 13 g g⁻¹ and 15.3 g g⁻¹, respectively) than at pH 1.2 (SW of 10 g g⁻¹ and 13 g g⁻¹), due to the ionization of the carboxyl groups (-COO⁻) present in the polysaccharide structure. The hydrogels based on CTS showed the opposite behavior, obtaining higher SW values in a buffer solution of pH 1.2 (3.44 g g⁻¹ for CTSA4 and 3.49 g g⁻¹ for CTSA5) than in pH 6.8 (2.98 g g⁻¹ and 2.80 g g⁻¹), as it has amine groups (-NH₂) in its structure. In this way, it was possible to conclude that the hydrogels produced had the potential to be used as drug delivery devices. Due to the better results obtained, the hydrogels based on XG followed the assays of controlled release of vitamin B₁₂ (VB₁₂) in a simulated gastrointestinal system. Thus, the hydrogels of formulation XGA5 (50.0 mg of XGm and 0.20 mL of DMA) and XGA6 (50.0 mg of XGm and 0.25 mL of DMA) were loaded with VB₁₂ by swelling in solution at the concentration of 100 µg mL⁻¹ and, once dry, the release tests were performed by swelling in a buffered system at pHs 1.2 and 6.8, with the determination of VB₁₂ released at defined time intervals, up to a total of 10 am From the assays, it was observed that the hydrogel of formulation XGA6 presented favorable characteristics for application as a vehicle for controlled release of VB₁₂ in the intestine, since it obtained a higher percentage of cumulative release at pH 6.8 (approximately 17%) than in pH 1.2 (approximately 13%) and a more controlled release in solution 6.8, in order to release smaller amounts of the drug per time interval.

Keywords: hydrogel, xanthan gum, chitosan, vitamin B₁₂, controlled release.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. TRABALHOS PUBLICADOS COM PALAVRA-CHAVE " <i>HYDROGEL</i> " NO TÍTULO, RESUMO E PALAVRAS-CHAVE DO AUTOR NOS ANOS DE 1995 A 2021 NA BASE DE DADOS WEB OF SCIENCE..... | 18 |
| FIGURA 2. TRABALHOS PUBLICADOS COM PALAVRA-CHAVE " <i>HYDROGEL; POLYSACCHARIDE</i> " NO TÍTULO, RESUMO E PALAVRAS-CHAVE DO AUTOR NOS ANOS DE 1995 A 2021 NA BASE DE DADOS WEB OF SCIENCE..... | 19 |
| FIGURA 3. TRABALHOS PUBLICADOS COM AS PALAVRAS-CHAVE (A) " <i>HYDROGEL; XANTHAN GUM</i> " E (B) " <i>HYDROGEL; CHITOSAN</i> " DOS ANOS 1991 A 2021 NAS BASES DE DADOS WEB OF SCIENCE..... | 20 |
| FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE HIDROGÉIS DE RETICULAÇÃO QUÍMICA (A) E FÍSICA (B). | 20 |
| FIGURA 5. COMPORTAMENTO DE HIDROGÉIS PH-RESPONSIVOS CONTENDO GRUPOS (A) ÁCIDO CARBOXÍLICO -COOH E (B) AMINA -NH ₂ | 26 |
| FIGURA 6. INTUMESCIMENTO DE UM HIDROGEL. HIDROGEL DE GX SECO (A) E HIDROGEL APÓS 25 HORAS DE INTUMESCIMENTO (B)..... | 27 |
| FIGURA 7. MODELO DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS: (A) LIBERAÇÃO RÁPIDA E (B) LIBERAÇÃO CONTROLADA. | 29 |
| FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE FÁRMACO A PARTIR DA MATRIZ POLIMÉRICA DO HIDROGEL, COMO RESULTADO DO SEU PROCESSO DE INTUMESCIMENTO. | 30 |
| FIGURA 9. ESTRUTURA QUÍMICA DA GOMA XANTANA. | 34 |
| FIGURA 10. ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITINA. | 36 |
| FIGURA 11. OBTENÇÃO DA QUITOSANA. | 37 |
| FIGURA 12. ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA..... | 38 |
| FIGURA 13. ESTRUTURA QUÍMICA DO METACRILATO DE GLICIDILA (GMA). ... | 40 |
| FIGURA 14. PRODUTOS DA REAÇÃO DE MODIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO COM GMA: 3-METACRILATOIL-1-GLICERIL ÉTER DE POLISSACARÍDEO (A) E 3-METACRILATOIL-2-GLICERIL ÉTER DE POLISSACARÍDEO (B). | 40 |
| FIGURA 15. REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO GERAL DA REAÇÃO DE MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE UM POLISSACARÍDEO COM GMA..... | 41 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 16. FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES POR MEIO DE CLIVAGEM DO PERSULFATO DE POTÁSSIO..... | 42 |
| FIGURA 17. ESTRUTURA DO MONÔMERO ESPAÇADOR <i>N,N'</i> -DIMETIL-ACRILAMIDA OU DMA..... | 42 |
| FIGURA 18. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA MATRIZ TRIDIMENSIONAL POLIMÉRICA DE UM HIDROGEL BASEADO EM POLISSACARÍDEO E DMA..... | 43 |
| FIGURA 19. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER PARA AS AMOSTRAS GMA, QTS E QTSM; EM (B) OBSERVAMOS A AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO NA REGIÃO 2000-1200 CM^{-1} | 49 |
| FIGURA 20. ASPECTO MACROSCÓPICO DO HIDROGEL BASEADO EM 200 MG DE QTSM E 0,5 ML DE DMA..... | 51 |
| FIGURA 21. ENSAIOS DE INTUMESCIMENTO DE HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO QTSA1, QTSA2 E QTSA3 EM ÁGUA DESTILADA: (A) VALORES DE GI NO EQUILÍBRIO E (B) PERFIL DE INTUMESCIMENTO. | 52 |
| FIGURA 22. ENSAIOS DE INTUMESCIMENTO DE HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO QTSB2 E QTSB3 EM ÁGUA DESTILADA: (A) VALORES DE GI NO EQUILÍBRIO E (B) PERFIL DE INTUMESCIMENTO. | 53 |
| FIGURA 23. VALORES DE GI MÉDIO NO EQUILÍBRIO DE INTUMESCIMENTO EM ÁGUA DESTILADA DE HIDROGÉIS BASEADOS EM QTSM..... | 56 |
| FIGURA 24. PERFIL DE INTUMESCIMENTO PARA OS HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO QTSA3, QTS4 E QTSA5 COM AJUSTE WEIBULL. | 58 |
| FIGURA 25. GRAU DE INTUMESCIMENTO DE HIDROGÉIS BASEADOS EM QTS APÓS 4H EM SOLUÇÃO TAMPÃO PH 1,2 E 6,8 A 37 °C..... | 59 |
| FIGURA 26. PERFIL DE INTUMESCIMENTO DE HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO QTSA4 EM SOLUÇÃO TAMPÃO DE H 1,2 E 6,8, À TEMPERATURA DE 37 °C. ... | 60 |
| FIGURA 27. CURVA-PADRÃO DE VITAMINA B ₁₂ EM ÁGUA DESTILADA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE 10,0 A 100,0 $\mu\text{G ML}^{-1}$ E 2,0 A 10,0 $\mu\text{G ML}^{-1}$ | 66 |
| FIGURA 28. CURVA DE PADRÃO EXTERNO DE VITAMINA B ₁₂ EM SOLUÇÃO TAMPÃO DE PH 1,2 PARA AS CONCENTRAÇÕES DE 10,0 A 100,0 $\mu\text{G ML}^{-1}$ E 2,0 A 10,0 $\mu\text{G ML}^{-1}$ | 67 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 29. CURVA DE PADRÃO EXTERNO DE VITAMINA B ₁₂ EM SOLUÇÃO TAMPÃO DE PH 6,8 PARA AS CONCENTRAÇÕES DE 10,0 A 100,0 µG ML ⁻¹ E 2,0 A 10,0 µG ML ⁻¹ | 67 |
| FIGURA 30. ESPECTROS NA REGIÃO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER PARA AS AMOSTRAS GMA, GX E GXM;..... | 69 |
| FIGURA 31. GRÁFICOS DE DECONVOLUÇÃO DO ESPECTRO DE FTIR PARA AS AMOSTRAS DE GX E GXM NO INTERVALO DE 1515 A 1830 CM ⁻¹ | 71 |
| FIGURA 32. ASPECTO MACROSCÓPICO DO HIDROGEL BASEADO EM 50,0 MG DE GXM E 50,0 µL DE DMA..... | 72 |
| FIGURA 33. ENSAIOS DE INTUMESCIMENTO DOS HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO GXA1, GXA2 E GXA3 EM ÁGUA DESTILADA: (A) GRAU DE INTUMESCIMENTO MÉDIO NO EQUILÍBRIO E (B) PERFIL DE INTUMESCIMENTO..... | 73 |
| FIGURA 34. ENSAIOS DE INTUMESCIMENTO DOS HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO GXB1, GXB2 E GXB3 EM ÁGUA DESTILADA: (A) GRAU DE INTUMESCIMENTO MÉDIO NO EQUILÍBRIO E (B) PERFIL DE INTUMESCIMENTO..... | 76 |
| FIGURA 35. VALORES OBTIDOS DE GRAU DE INTUMESCIMENTO NO EQUILÍBRIO EM ÁGUA DESTILADA PARA OS HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO GXA. | 79 |
| FIGURA 36. PERFIL DE INTUMESCIMENTO PARA OS HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO GXA3, GXA4, GXA5 E GXA6 COM AJUSTE DA FUNÇÃO WEIBULL..... | 81 |
| FIGURA 37. CONTRIBUIÇÃO DOS MECANISMOS DE DIFUSÃO FICKIANA E RELAXAÇÃO MACROMOLECULAR PARA O MECANISMO GERAL DE TRANSPORTE DE ÁGUA PARA OS HIDROGÉIS GXA3 (A) E GXA5 (B). | 83 |
| FIGURA 38. IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA PARA OS HIDROGÉIS GXA3 (A), GXA4 (B), GXA5, (C) E GXA6 (D) APÓS ATINGIR O EQUILÍBRIO DE INTUMESCIMENTO EM ÁGUA DESTILADA..... | 84 |
| FIGURA 39. PERFIL DE INTUMESCIMENTO EM SOLUÇÕES TAMPÃO DE PH 1,2 E 6,8 PARA OS HIDROGÉIS GXA3 (A), GXA4 (B), GXA5 (C) E GXA6 (D)..... | 85 |
| FIGURA 40. CONTRIBUIÇÃO DA DIFUSÃO FICKIANA E RELAXAÇÃO MACROMOLECULAR PARA O MECANISMO DE TRANSPORTE ANÔMALO DOS HIDROGÉIS GXA3 (A) E GXA4 (B) EM ENSAIOS DE INTUMESCIMENTO DE SOLUÇÃO TAMPÃO DE PH 1,2, A 37 °C..... | 88 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 41. PERFIL DE CONTRIBUIÇÃO PARA O MECANISMO DE TRANSPORTE ANÔMALO PARA OS ENSAIOS DE INTUMESCIMENTO DOS HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO GXA3 (A), GXA4 (B), GXA5 (C) E GXA6 (D) EM ENSAIOS DE INTUMESCIMENTO EM SOLUÇÃO TAMPÃO DE PH 6,8 A 37 °C..... | 89 |
| FIGURA 42. PERFIL DE INTUMESCIMENTO PARA OS HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO GXA3 (A), GXA4 (B), GXA5 (C) E GXA6 (D) EM SISTEMA GASTROINTESTINAL SIMULADO. | 90 |
| FIGURA 43. LIBERAÇÃO ACUMULATIVA DA VITAMINA B ₁₂ NAS SOLUÇÕES TAMPÕES DE PH 1,2 E 6,8 PARA OS HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO GXA5 (A) E GXA6 (B)..... | 91 |
| FIGURA 44. PERFIL DA LIBERAÇÃO VITAMINA B ₁₂ (C _T /C _{EQ}) EM FLUIDO GÁSTRICO (PH 1,2) E INTESTINAL (PH 6,8) SIMULADO, PARA OS HIDROGÉIS GXA5 AO LONGO DE 10 HORAS DE EXPERIMENTO, A 37 °C..... | 92 |
| FIGURA 45. PERFIL DA LIBERAÇÃO VITAMINA B ₁₂ (C _T /C _{EQ}) EM FLUIDO GÁSTRICO (PH 1,2) E INTESTINAL (PH 6,8) SIMULADO, PARA OS HIDROGÉIS GXA6 AO LONGO DE 10 HORAS DE EXPERIMENTO, A 37 °C..... | 93 |
| FIGURA 46. ESTRUTURA QUÍMICA DA COBALAMINA. | 94 |
| FIGURA 47. CONTRIBUIÇÃO DA DIFUSÃO FICKIANA E RELAXAÇÃO MACROMOLECULAR PARA O MECANISMO DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO EM ENSAIOS DE SOLUÇÃO TAMPÃO DE PH 6,8 PARA OS HIDROGÉIS GXA5 (A) E GXA6 (B)..... | 96 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1. POSSÍVEIS CLASSIFICAÇÕES PARA OS HIDROGÉIS. | 22 |
| TABELA 2. HIDROGÉIS PH-RESPONSIVOS BASEADOS EM POLISSACARÍDEOS: COMPOSIÇÃO E APLICAÇÃO RELATADA NA LITERATURA. | 24 |
| TABELA 3. MECANISMOS DE TRANSPORTE PARA O MODELO DA LEI DE POTÊNCIA PARA MATERIAIS COM GEOMETRIA CILÍNDRICA. | 28 |
| TABELA 4. FORMULAÇÕES DE HIDROGÉIS A BASE DE QTSM E DMA SINTETIZADOS. | 47 |
| TABELA 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA ANOVA DE FATOR ÚNICO PARA HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO QTSA1, QTSA2 E QTSA3. | 53 |
| TABELA 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA ANOVA DE FATOR ÚNICO PARA HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO QTSB1, QTSB2 E QTSB3. | 54 |
| TABELA 7. MECANISMO DE INTUMESCIMENTO DE HIDROGÉIS BASEADOS EM QTSM. | 55 |
| TABELA 8. MECANISMO DE INTUMESCIMENTO PARA HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO QTSA. | 57 |
| TABELA 9. ANÁLISE ESTATÍSTICA ANOVA DE FATOR ÚNICO PARA HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO QTSA. | 57 |
| TABELA 10. VALORES ENCONTRADOS PARA AS CONSTANTES K E D OBTIDAS A PARTIR DO AJUSTE DA FUNÇÃO WEIBULL PARA OS HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO QTS3, QTSA4 E QTSA5. | 58 |
| TABELA 11. VALORES DAS CONSTANTES K E D PARA O INTUMESCIMENTO DOS HIDROGÉIS QTSA4 EM SOLUÇÕES TAMPÃO DE PH 1,2 E 6,8. | 61 |
| TABELA 12. MECANISMO DE INTUMESCIMENTO PARA HIDROGÉIS QTSA4 E QTSA5 EM SOLUÇÕES TAMPÃO A 37 °C. | 61 |
| TABELA 13. FORMULAÇÕES DE HIDROGÉIS A BASE DE GXM E DMA SINTETIZADOS. | 64 |
| TABELA 14. VALORES DE NÚMERO DE ONDA E AMPLITUDE PARA OS GRÁFICOS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA AS AMOSTRAS DE GX E GXM. | 71 |
| TABELA 15. ANÁLISE ESTATÍSTICA ANOVA DE FATOR ÚNICO PARA HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO GXA1, GXA2 E GXA3. | 74 |

| | |
|--|----|
| TABELA 16. ANÁLISE ESTATÍSTICA ANOVA DE FATOR ÚNICO PARA HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO GXB1, GXB2 E GXB3..... | 76 |
| TABELA 17. MECANISMO DE INTUMESCIMENTO EM ÁGUA DESTILADA DE HIDROGÉIS BASEADOS EM GX. | 77 |
| TABELA 18. VALORES OBTIDOS ATRAVÉS DO AJUSTE DA LEI DA POTÊNCIA E AJUSTE WEIBULL PARA OS HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO GXA3, GXA4, GXA5 E GXA6. | 80 |
| TABELA 19. VALORES DAS CONSTANTES DE DIFUSÃO FICKIANA E RELAXAÇÃO MACROMOLECULAR PARA OS HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO GXA3 E GXA5 EM ENSAIOS DE INTUMESCIMENTO EM ÁGUA DESTILADA..... | 82 |
| TABELA 20. VALORES DE GI NO EQUILÍBRIO E COEFICIENTE DE DIFUSÃO (N) PARA OS HIDROGÉIS GXA3, GXA4, GXA5 E GXA6 EM SOLUÇÕES TAMPÃO DE PH 1,2..... | 87 |
| TABELA 21. VALORES DE GI NO EQUILÍBRIO E COEFICIENTE DE DIFUSÃO (N) PARA OS HIDROGÉIS GXA3, GXA4, GXA5 E GXA6 EM SOLUÇÕES TAMPÃO DE PH 6,8..... | 87 |
| TABELA 22. VALORES DAS CONSTANTES DE DIFUSÃO FICKIANA E RELAXAÇÃO PARA O MECANISMO DE TRANSPORTE ANÔMALO EM ENSAIOS DE INTUMESCIMENTO EM SOLUÇÃO TAMPÃO DE PH 6,8 PARA OS HIDROGÉIS DE FORMULAÇÃO GXA3, GXA4, GXA5 E GXA6. | 88 |
| TABELA 23. VALORES DA CONSTANTE K_D E K_R NO MECANISMO DE LIBERAÇÃO DE VB ₁₂ ENCONTRADAS PELO AJUSTE PEPPAS-SAHLIN..... | 95 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|-------|--|
| DMA | <i>N,N'</i> -dimetil-acrilamida |
| EP | <i>European Pharmacopeia</i> |
| FTIR | <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> (Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier) |
| GA | Grau de acetilação |
| GD | Grau de desacetilação |
| GI | Grau de intumescimento |
| GMA | Metacrilato de glicidila |
| GX | Goma xantana |
| GXm | Goma Xantana modificada com metacrilato de glicidila |
| GXA1 | Hidrogel de GX contendo 50,0 mg de GXm e 0,030 mL de DMA |
| GXA2 | Hidrogel de GX contendo 50,0 mg de GXm e 0,050 mL de DMA |
| GXA3 | Hidrogel de GX contendo 50,0 mg de GXm e 0,070 mL de DMA |
| GXA4 | Hidrogel de GX contendo 50,0 mg de GXm e 0,150 mL de DMA |
| GXA5 | Hidrogel de GX contendo 50,0 mg de GXm e 0,200 mL de DMA |
| GXA6 | Hidrogel de GX contendo 50,0 mg de GXm e 0,250 mL de DMA |
| GXB1 | Hidrogel de GX contendo 80,0 mg de GXm e 0,060 mL de DMA |
| GXB2 | Hidrogel de GX contendo 80,0 mg de GXm e 0,080 mL de DMA |
| GXB3 | Hidrogel de GX contendo 80,0 mg de GXm e 0,100 mL de DMA |
| IPN | Hidrogel multipolimérico interpenetrante |
| QT | Quitina |
| QTS | Quitosana |
| QTSm | Quitosana modificada com metacrilato de glicidila |
| QTSA1 | Hidrogel de QTS contendo 500,0 mg de QTSm e 0,300 mL de DMA |
| QTSA2 | Hidrogel de QTS contendo 500,0 mg de QTSm e 0,500 mL de DMA |
| QTSA3 | Hidrogel de QTS contendo 500,0 mg de QTSm e 0,700 mL de DMA |
| QTSA4 | Hidrogel de QTS contendo 500,0 mg de QTSm e 1,500 mL de DMA |
| QTSA5 | Hidrogel de QTS contendo 500,0 mg de QTSm e 2,000 mL de DMA |
| QTSA6 | Hidrogel de QTS contendo 500,0 mg de QTSm e 2,500 mL de DMA |
| QTSB1 | Hidrogel de QTS contendo 550,0 mg de QTSm e 0,350 mL de DMA |
| QTSB2 | Hidrogel de QTS contendo 550,0 mg de QTSm e 0,550 mL de DMA |

| | |
|------------------|---|
| QTSB3 | Hidrogel de QTS contendo 550,0 mg de QTSm e 0,770 mL de DMA |
| semi-IPN | Hidrogel com redes poliméricas semi-interpenetrante |
| USP | <i>United States Pharmacopeia</i> |
| VB ₁₂ | Vitamina B ₁₂ |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | JUSTIFICATIVA | 15 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 2.1 | ESTADO DA ARTE | 17 |
| 2.1.1 | <i>Classificação dos hidrogéis baseada em interações químicas entre as cadeias</i> | 20 |
| 2.1.2 | <i>Hidrogéis pH-responsivos</i> | 23 |
| 2.2 | MECANISMOS DE INTUMESCIMENTO | 26 |
| 2.3 | APLICAÇÃO DE HIDROGÉIS POLIMÉRICOS NA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS | 29 |
| 2.4 | POLISSACARÍDEOS | 32 |
| 2.4.1 | <i>Goma Xantana</i> | 33 |
| 2.4.2 | <i>Quitosana</i> | 35 |
| 2.4.3 | <i>Modificação Química de polissacarídeos com Metacrilato de Glicidila</i> | 39 |
| 2.5 | FORMAÇÃO DE HIDROGÉIS POLIMÉRICOS BASEADOS EM POLISSACARÍDEOS | 42 |
| 3 | DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA E HIPÓTESES | 44 |
| 4 | OBJETIVOS | 45 |
| 4.1 | OBJETIVO GERAL | 45 |
| 4.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 45 |
| 5 | SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS BASEADOS EM QUITOSANA | 46 |
| 5.1 | MATERIAL E MÉTODOS | 46 |
| 5.1.1 | <i>Material</i> | 46 |
| 5.1.2 | <i>Modificação química da quitosana</i> | 46 |
| 5.1.3 | <i>Preparo e caracterização dos hidrogéis</i> | 46 |
| 5.1.4 | <i>Preparo de fluido gastrointestinal simulado</i> | 47 |
| 5.1.5 | <i>Ensaio de intumescimento</i> | 48 |
| 5.2 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 49 |
| 5.2.1 | <i>Modificação química da quitosana</i> | 49 |
| 5.2.2 | <i>Síntese de hidrogéis baseados em QTSm</i> | 51 |
| 5.2.3 | <i>pH-responsividade de hidrogéis baseados em QTSm</i> | 59 |
| 5.3 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 62 |
| 5.4 | PERSPECTIVAS FUTURAS | 62 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 6 | SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS BASEADOS EM GOMA XANTANA PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE VITAMINA B12 | 63 |
| 6.1 | MATERIAL E MÉTODOS | 63 |
| 6.1.1 | <i>Material</i> | 63 |
| 6.1.2 | <i>Modificação química da goma xantana</i> | 63 |
| 6.1.3 | <i>Preparo e caracterização dos hidrogéis</i> | 64 |
| 6.1.4 | <i>Preparo de fluido gastrointestinal simulado</i> | 64 |
| 6.1.5 | <i>Ensaio de intumescimento</i> | 65 |
| 6.1.6 | <i>Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura</i> | 66 |
| 6.1.7 | <i>Ensaio de liberação de Vitamina B₁₂</i> | 66 |
| 6.2 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 69 |
| 6.2.1 | <i>Modificação química da Goma Xantana</i> | 69 |
| 6.2.2 | <i>SÍNTESE DE HIDROGÉIS BASEADOS EM GXm</i> | 72 |
| 6.2.3 | <i>pH-responsividade de hidrogéis baseados em GXm</i> | 84 |
| 6.2.4 | <i>Liberação de vitamina B₁₂</i> | 91 |
| 6.3 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 97 |
| 6.4 | PERSPECTIVAS FUTURAS | 97 |
| | REFERÊNCIAS | 98 |
| | ANEXO A - RESULTADOS OBTIDOS PARA O TESTE T DE STUDENT PARA HIDROGÉIS BASEADOS EM GX | 108 |
| | ANEXO B - RESULTADOS OBTIDOS PARA O TESTE T DE STUDENT PARA HIDROGÉIS BASEADOS EM QTS | 109 |
| | ANEXO C - RESULTADOS OBTIDOS PARA O TESTE T DE STUDENT PARA LIBERAÇÃO DE VB12 EM HIDROGÉIS GXA5 E GXA6 | 110 |

1 JUSTIFICATIVA

As avitaminoses, ou deficiência de vitaminas, podem ser decorrentes de uma dieta desbalanceada ou a dificuldade de absorção do organismo. A vitamina B₁₂, por exemplo, quando em quantidades insuficientes, pode gerar o desenvolvimento de anemia perniciosa ou a deterioração do Sistema Nervoso Central (SARTI et al., 2013). Para uma possível suplementação, a liberação da Vitamina B₁₂ no estômago não é preferível devido sua instabilidade em pH ácido (NATH & DOLUI, 2018). Desta forma, a sua liberação no intestino, local de sua absorção, se tornaria viável com a utilização de dispositivos inteligentes capazes de responder a mudanças de estímulo externo, como o pH, direcionando assim a entrega do fármaco no ambiente de interesse. A capacidade de alguns hidrogéis de responderem à mudanças de pH viabiliza a sua aplicação como veículo de liberação controlada de fármacos no organismo, sendo assim um possível material a ser empregado em processos de suplementação vitamínica (HANNA & SAAD, 2019).

O hidrogel é uma rede tridimensional polimérica capaz de absorver água ou fluídos biológicos (HAJIKHANI et al., 2019). Em diversos estudos de síntese de hidrogéis foram relatados o uso de polímeros de origem sintética ou natural como matéria-prima. A literatura ainda demonstra que para os diversos hidrogéis, podem possuir uma estrutura química definida, ausência de patogenicidade, capacidade de responder a estímulos químicos e físicos, propriedades mecânicas favoráveis a diversas aplicações e capacidade de degradação controlada, sendo assim, caracterizados como materiais inteligentes (AHMED, 2015; NGUYEN & ALSBERG, 2014).

Dentre os polímeros utilizados para a síntese de hidrogéis, polissacarídeos naturais são interessantes já que possuem estrutura polimérica e hidrofílica. Outras características que chamam atenção para esses biopolímeros são a sua abundância natural, biocompatibilidade, biodegradabilidade e ausência de toxicidade. Hidrogéis com estas características podem ser aplicados em diversas áreas como na biomedicina para a liberação de fármacos, engenharia de tecidos, músculos artificiais e sensores e na área ambiental para o controle de poluentes, absorção de resíduos, tratamento de água e efluentes, entre outros (BUENO et al., 2013; GARNER & PARK, 2014; TANG et al., 2021).

Neste contexto, a goma xantana (GX), que é um polissacarídeo de caráter aniônico solúvel em água, é amplamente empregado na indústria como espessante alimentício e em formulações

cosméticas (ZHANG & LING, 2021). A quitosana (QTS) é um polissacarídeo de caráter catiônico, já explorado na síntese de hidrogéis especialmente voltados para a biomedicina (PELLÁ et al., 2018). Reconhecida a potencialidade destes polímeros, neste trabalho tem-se como objetivo utilizar a GX e a QTS em associação ao agente espaçador foram *N',N'*-dimetil-acrilamida (DMA) como materiais para a síntese de hidrogéis pH-responsivos, cujas características físico-químicas lhes permitam serem aplicados em sistemas de liberação controlada de Vitamina B₁₂.

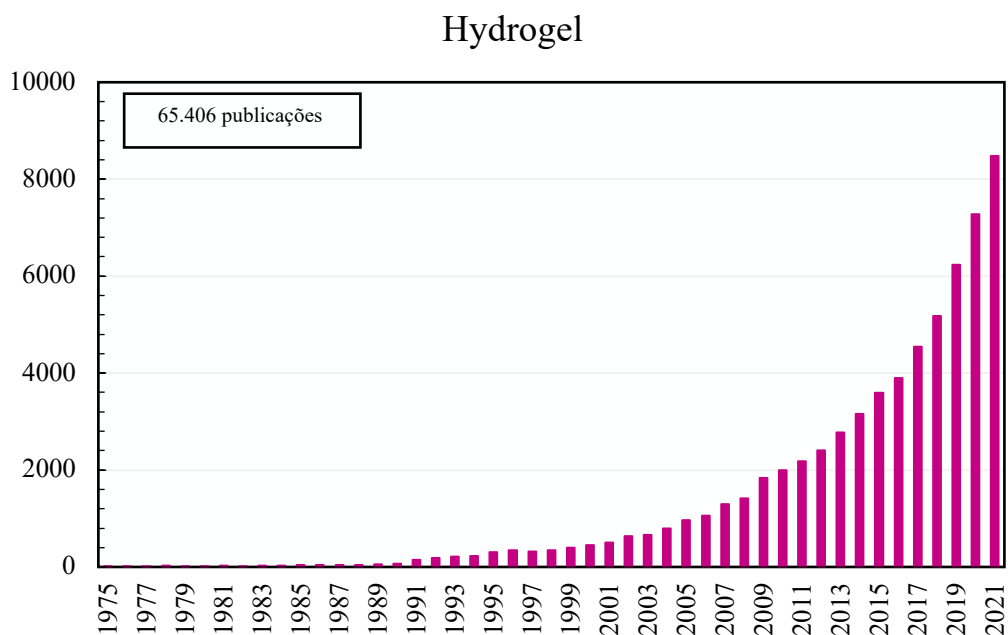
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTADO DA ARTE

Hidrogéis podem ser definidos como uma rede polimérica reticulada formada pela reação de um ou mais monômeros e que possuem a capacidade de absorver e reter uma quantidade significativa de água ou fluídos biológicos em sua estrutura (AHMED, 2015). Estes materiais ganharam destaque devido a capacidade de manipulação de algumas de suas propriedades físico-químicas de acordo com sua formulação, permitindo assim comportarem-se como materiais inteligentes, já que uma pequena mudança no ambiente em que se encontram pode resultar em uma resposta significativa no comportamento de sua matriz polimérica (POTAFEUX et al., 2020). Tal comportamento muitas vezes mostra-se reversível, já que, uma vez retirado o estímulo externo, o hidrogel pode retornar ao estado inicial (AHMAD et al., 2019). A presença de grupos funcionais hidrofílicos na estrutura polimérica do hidrogel (por exemplo -OH, -COOH) reflete em sua capacidade de intumescer em água e fluídos biológicos (DERAKHSHANKAH et al. 2022).

A capacidade de intumescimento pode ser alterada a partir da manipulação de alguns parâmetros, como a natureza da reticulação da cadeia polimérica, a técnica de polimerização utilizada e a inserção de grupos funcionais na matriz. Juntamente com a capacidade de absorção, algumas destas manipulações na estrutura fornecem ao material a responsividade a estímulos externos, como a mudança de temperatura, pH, campo magnético e força iônica do meio (SHARMA et al., 2017). Tais características dos hidrogéis lhes permitem serem aplicados em diversas áreas da ciência e da tecnologia, despertando assim enorme interesse no meio científico. Desta forma, o estudo destes materiais tem crescido de forma acentuada ao longo dos anos, especialmente a partir de 2000, tendo em vista que na base de dados “Web Of Science”, um total de sessenta e cinco mil quatrocentos e seis (65.406) trabalhos podem ser encontrados com o termo “*hydrogel*” no título, resumo ou palavras-chave do autor utilizando o operador booleano “*or*”, conforme consulta realizada em 22/03/2022, sendo o artigo mais antigo encontrado datado ao ano de 1946. O número de publicações entre os anos de 1975 e 2021 na plataforma Web Of Science está representado na Figura 1.

Figura 1. Trabalhos publicados com palavra-chave "hydrogel" no título, resumo e palavras-chave do autor nos anos de 1995 a 2021 na base de dados Web of Science.

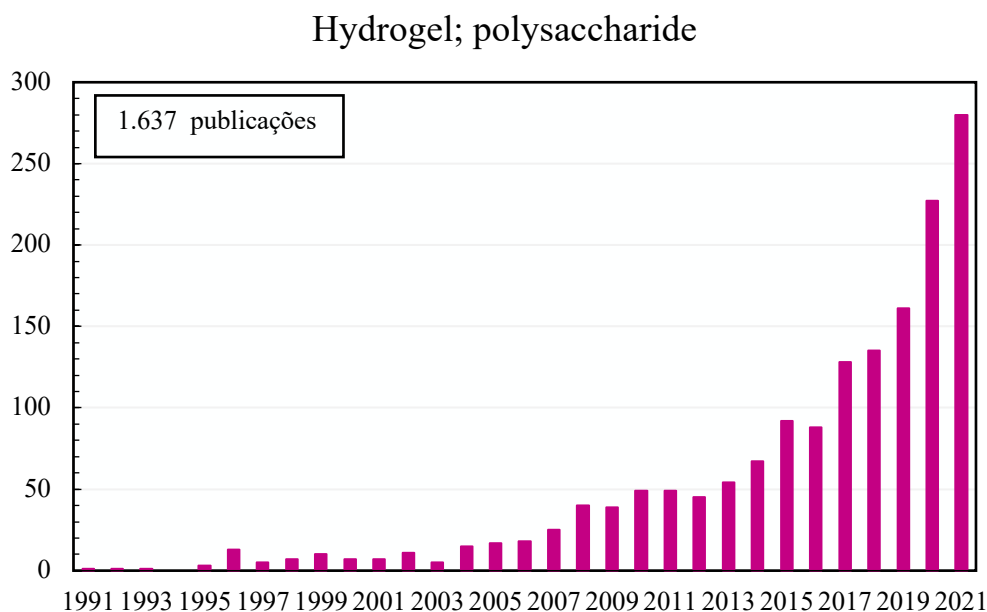


Fonte: a autora.

Polímeros naturais ou sintéticos podem ser empregados na síntese de hidrogéis. Porém, biopolímeros se tornaram de maior interesse devido sua biocompatibilidade e atoxicidade, sendo que os polissacarídeos naturais têm ganhado destaque em estudos destinados a aplicações biológicas e ambientais (AHMAD et al., 2019; JIANG et al., 2020).

Quando a mesma busca por artigos foi realizada associando-se os termos “*hydrogel; polysaccharide*” utilizando o operador booleano “*or*” para busca no título, resumo ou palavras-chave do autor, o número total de trabalhos publicados identificados no “Web Of Science” foi de mil seiscentos e trinta e sete (1.637), sendo o mais antigo datado ao ano de 1983, contudo observando-se um aumento significativo no interesse em se produzir hidrogéis a base destes biopolímeros a partir do ano de 2008 (conforme consulta realizada em 22/03/2022). A quantidade de trabalhos publicados por ano está representada na Figura 2.

Figura 2. Trabalhos publicados com palavra-chave "*hydrogel; polysaccharide*" no título, resumo e palavras-chave do autor nos anos de 1995 a 2021 na base de dados Web of Science.



Fonte: a autora.

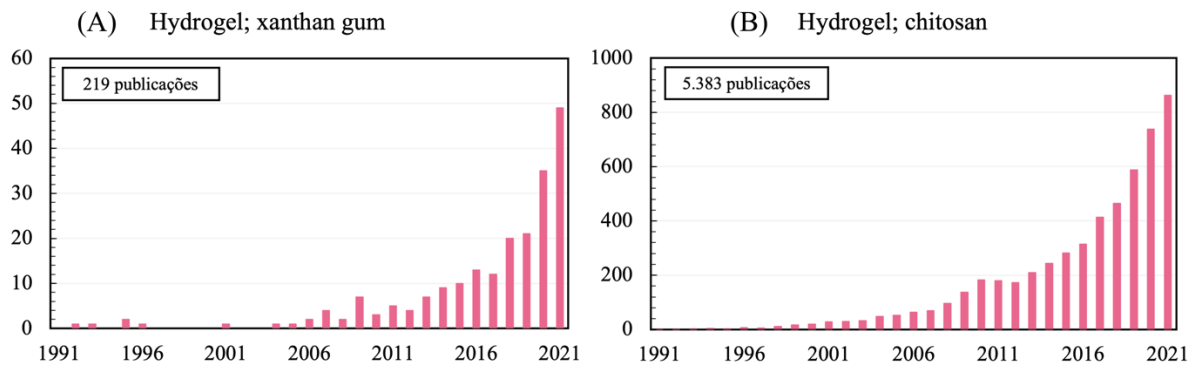
Para a síntese de hidrogéis pH-responsivos, utiliza-se polissacarídeos que apresentam grupos funcionais capazes de serem ionizáveis. Dentre estes grupamentos podemos citar a carboxila (-COOH), a qual está presente na estrutura da goma xantana (GX), um polissacarídeo atóxico e biocompatível, muito citado na literatura (ZHU et al. 2022) e que é a base para a síntese de hidrogéis neste presente trabalho.

Se tratando de hidrogéis a base de GX, utilizando como parâmetro de busca das palavras-chave no título, resumo e palavras-chave do autor os termos "*hydrogel; xanthan gum*" com operador booleano "or"; foram encontrados duzentos e dezoito (218) trabalhos científicos na plataforma "Web of Science" a partir do ano de 1992, e de forma mais acentuada a partir do ano de 2004, conforme consulta realizada em 22/03/2022.

Outro biopolímero que apresenta grupamento funcional ionizável é a quitosana (QTS), a qual mostra-se rica em grupamentos amina (-NH₂) e cuja utilização na síntese de hidrogéis pH-responsivos já é relatada na literatura (GAURI et al. 2022). Artigos que utilizam a QTS para esta finalidade foram encontrados em abundância, totalizando cinco mil trezentos e oitenta e três (5.383) publicações quando pesquisadas as palavras-chave "*hydrogel; chitosan*" no título, resumo e palavras-chave do autor utilizando o operador booleano "or" na base de dados "Web Of Science", sendo que os trabalhos começaram a ser publicados a partir do ano de 1991, se

tornando mais abundantes a partir do ano 2000, conforme consulta realizada em 24/02/2022. O número de trabalhos publicados por ano no intervalo de 1991 a 2021 estão representados na Figura 3.

Figura 3. Trabalhos publicados com as palavras-chave (A) "hydrogel; xanthan gum" e (B) "hydrogel; chitosan" dos anos 1991 a 2021 nas bases de dados Web of Science.

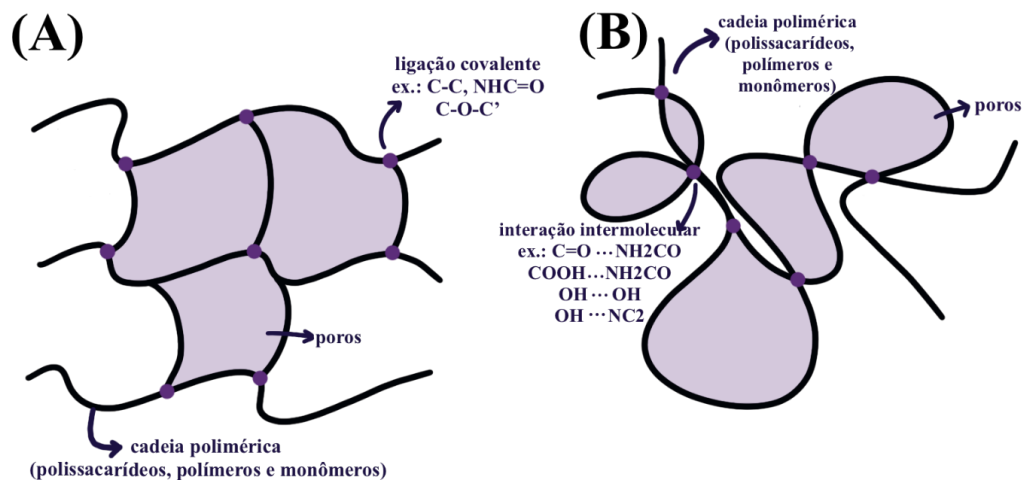


Fonte: a autora.

2.1.1 Classificação dos hidrogéis baseada em interações químicas entre as cadeias

Os hidrogéis podem ser classificados dependendo da natureza das ligações cruzadas que formam a rede tridimensional polimérica, podendo ser químicos (ligações covalentes) ou físicos (interações intermoleculares, eletrostáticas e hidrofóbicas e/ou ligações de hidrogênio), de acordo com a apresentação esquemática da Figura 4.

Figura 4. Representação da estrutura de hidrogéis de reticulação química (a) e física (b).



Fonte: adaptado de YONEZAWA, U. G. (2016).

Hidrogéis químicos, também denominados de irreversíveis, são formados a partir da ligação covalente entre os monômeros e/ou polímeros que formam a rede tridimensional. Podem ser sintetizados a partir de polímeros naturalmente hidrossolúveis ou via modificação química de polímeros hidrofóbicos com a inserção de grupamentos hidrofílicos e posterior reação de reticulação (AHMED, E. M., 2015). A capacidade absorviva dos hidrogéis químicos pode ser alterada dependendo do grau de reticulação (HOFFMAN, A. S., 2012). Estes materiais não são homogêneos, já que a densidade de cadeia pode se alterar na matriz polimérica dependendo do grau de reticulação do hidrogel.

Também há a presença de polímeros ou monômeros que não estão reticulados na estrutura do material. Em regiões de maior densidade de cadeia, denominado *clusters*, a capacidade de intumescimento do hidrogel é reduzida se comparada com regiões de menor grau de reticulação. A formação de *clusters* ao longo da matriz pode ocorrer devido a agregação de cadeias hidrofóbicas dos agentes de reticulação (HOFFMAN, A. S., 2012). As ligações covalentes que formam a matriz polimérica do hidrogel podem consistir na polimerização de grupamentos vinílicos (-C=C) (PELLÁ et al., 2020), na formação de grupamentos amida (-NHC=O) em reações de polimerização de grupos amina (CHEN et al., 2004; KIM & PARK, 2016), em formação de ligações de grupamento éter (-C-O-C') (BARBUCCI et al., 2008; TANG et al., 2021).

Hidrogéis físicos são materiais em que a formação do gel ocorre a partir de interações intermoleculares entre os monômeros e/ou polímeros, sendo elas interações intermoleculares, eletrostáticas e hidrofóbicas e/ou ligações de hidrogênio (AHMED et al., 2015). Esta matriz não é homogênea, considerando que as interações podem gerar pontos de heterogeneidade e as cadeias poliméricas podem gerar extremidades de cadeias livres. Considerando que a natureza das interações para a formação da cadeia polimérica é inteiramente física, a formação deste tipo de hidrogel pode ser reversível, portanto, também são denominados hidrogéis reversíveis (HOFFMAN, 2012; PAHRI, 2017). As interações que ocorrem no hidrogel físico podem ser de ligação de hidrogênio, por exemplo entre um grupamento carbonila e amida (-C=O...NH₂CO), carboxila e amida (-COOH...NH₂CO), hidroxilas (O-H...H-O) e hidroxilas e amida (O-H...N-C) (GONG et al. 2017; LI et al. 2022, LIU et al. 2020) ou interações iônicas, com o uso de cátions e ânions para a formação do hidrogel por atração eletrostática ou pela formação de complexos de coordenação (GETACHEW et al. 2018; LIU, et al. 2018)

Independente da formação dos materiais, alguns hidrogéis podem ser danificados por se tratar de materiais macios. A quebra de pontos de reticulação, em alguns casos, pode ser

recuperada em materiais *self-healing*, ou seja, que apresentam um processo de autocura. Este processo pode ocorrer por características intrínsecas do material com rede polimérica reversível, como a presença de ligações covalentes dinâmicas e interações físicas. O mesmo material autocurante pode conter uma mistura de tipos de reticulação, diversificando os mecanismos envolvidos no processo de formação de novas ligações cruzadas (FAN et al., 2019).

Os hidrogéis podem ainda ser classificados de acordo com outros critérios (Tabela 1), além de físicos e químicos, como por exemplo em virtude da presença de carga iônica e de um possível comportamento responsivo à estímulos externos.

Tabela 1. Possíveis classificações para os hidrogéis.

| Classificação quanto a | Subclassificação | Descrição |
|-------------------------------|------------------------------|---|
| Reticulação | <i>Químico</i> | Ligações cruzadas formadas por ligações químicas |
| | <i>Físico</i> | Ligações cruzadas formadas por interações intermoleculares |
| Carga iônica | <i>Neutro</i> | Não possui carga iônica |
| | <i>Iônico</i> | Possui carga, podendo ser aniônico ou catiônico |
| | <i>Eletrólito anfótero</i> | Possui grupos ácidos e básicos em sua estrutura |
| | <i>Zwitteriônico</i> | Possui grupos aniônicos e catiônicos em cada unidade de repetição |
| Responsividade | <i>Estímulos químicos</i> | Responde a estímulos de mudança de pH, força iônica e demais agentes químicos |
| | <i>Estímulos bioquímicos</i> | Responde a estímulos de enzimas, antígenos e fármacos bioquímicos |
| | <i>Estímulos físicos</i> | Responde a estímulos de mudança de temperatura, luz, campo eletromagnético |

Fonte: AHMAD et al. 2019; AHMED, E. M. 2015.

Se tratando dos materiais utilizados na síntese de hidrogéis, os monômeros são moléculas de baixo peso molecular capazes de sofrerem reações de polimerização; macromonômeros contudo, são capazes de atuar como uma unidade monomérica, possuindo grupamentos passíveis de polimerização (MATYJASZEWSKI & MÖLLER, 2012). Polímeros são macromoléculas formadas por unidades de repetição (monômeros ou macromonômeros)

ligados covalentemente por reações de polimerização. Nos polímeros, as unidades monoméricas podem ser iguais ou distintas (MURI, E. M. F., 2019). A escolha dos monômeros, macromonômeros ou polímeros a serem utilizados pode variar desde o uso de apenas uma espécie hidrofílica (homopolimérico) ou duas ou mais espécies (copolimérico). O uso de dois polímeros distintos na formação de um hidrogel pode gerar dois produtos, dependendo dos reagentes escolhidos: os hidrogéis multipoliméricos interpenetrantes (IPN), em que as diferentes cadeias poliméricas estão reticuladas entre si na matriz do hidrogel ou então um hidrogel multipolimérico semi-interpenetrante (semi-IPN), em que apenas um polímero está reticulado e o outro se encontra disperso na matriz.

A técnica de polimerização empregada na formação do hidrogel pode definir sua aparência física, sendo uma matriz, um filme, nanopartícula, cápsula ou microesfera. Também podem ser divididos em materiais biodegradáveis ou não-biodegradáveis (AHMED, 2015, BATISTA et al., 2018, HOFFMAN, 2012).

As diferentes maneiras de sintetizar a matriz polimérica tridimensional, afetam diretamente algumas propriedades que o material apresentará, como por exemplo, o grau de reticulação e a capacidade de absorção ou intumescimento do hidrogel. A capacidade de responder a estímulos externos também está relacionada à sua composição química e forma física (BATISTA et al., 2018).

2.1.2 *Hidrogéis pH-responsivos*

Como citado anteriormente, hidrogéis poliméricos baseados em polímeros iônicos podem conter em sua estrutura grupos funcionais passíveis de serem ionizados com a mudança de pH do meio em que se encontram. A responsividade é caracterizada pelo grau de intumescimento (GI) do material em soluções de diferentes pHs, ou seja, um maior intumescimento se refere à maior responsividade do material em determinada condição, neste caso, de pH (AHMED, 2015; MEHRA et al. 2021).

Diferentes polissacarídeos podem ser utilizados na síntese destes hidrogéis, devido à presença de grupamentos funcionais naturais ou quimicamente adicionados, passíveis de sofrerem ionização. Materiais biocompatíveis que apresentem estas propriedades podem ser utilizados de diversas maneiras na área farmacêutica, como na aplicação cutânea ou subcutânea, no encapsulamento de fármacos para administração via oral e intravenosa; área biomédica,

ambiental e na agrícola. (AHMAD et al., 2019; JIANG et al., 2020; WELLS et al., 2019), como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Hidrogéis pH-responsivos baseados em polissacarídeos: composição e aplicação relatada na literatura.

| Composição do hidrogel | Aplicação | Referência |
|---|--|---------------------------------------|
| Alginato | <i>liberação da proteína albumina sérica bovina</i> | LIMA, D. S. et al., 2018 |
| Carboximetil celulose, cistamina e dopamina | <i>liberação controlada do agroquímico 6-benziladenina</i> | GUO, T. et al., 2021 |
| Goma arábica | <i>liberação de fármaco fotossensibilizador para terapia fotodinâmica no tratamento de câncer gastrointestinal</i> | VILSINSKI, B. H. et al., 2021 |
| Goma karaya | <i>adsorção e sequestro de pigmentos catiônicos</i> | PREETHA, B. K., VISHALAKSHI, B., 2020 |
| Pectina e zeína | <i>liberação do fármaco anticancer Doxorubicina</i> | KAUSHIK, P. et al., 2020 |
| Polissacarídeos de casca de soja | <i>liberação de isoflavona, potencial aplicação na indústria alimentícia e cosmética</i> | WANG, S. et al., 2020 |
| Quitina, ácido tânico e íon férrico | <i>curativo com propriedades antibacterianas</i> | MA, M., ZHONG, Y., JIANG, X., 2020 |
| Quitosana e ácido hialurônico | <i>liberação do fármaco Cortex Moutan para tratamento de dermatite atópica</i> | CHATTERJEE, S. et al., 2020. |

Fonte: a autora.

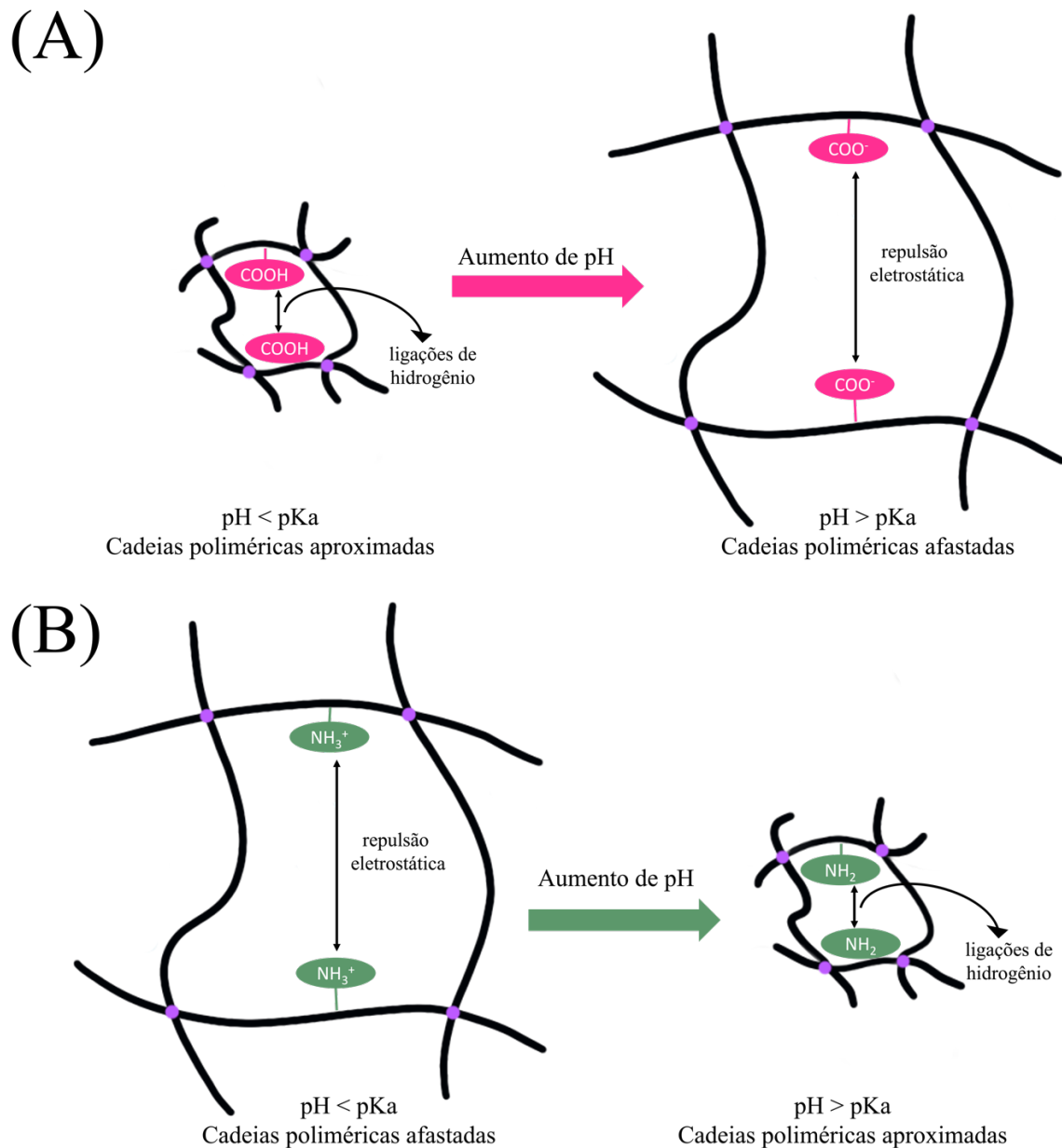
Alterações de pH do meio promovem a troca de prótons em moléculas iônicas, podendo criar ou desfazer interações intermoleculares e alterar a solubilidade ou outras propriedades físico-químicas, tais como: velocidade de degradação, flexibilidade, adesão, capacidade de se tornar um material injetável e alterar sua resistência mecânica. Materiais biocompatíveis que apresentem estas propriedades podem ser utilizados de diversas maneiras na área farmacêutica, como na aplicação cutânea ou subcutânea, no encapsulamento de fármacos para administração via oral e intravenosa (WELLS et al, 2019).

A presença de grupos que respondem ao pH alteram o comportamento de intumescimento do material devido a interações intermoleculares presentes na matriz

polimérica tridimensional (Figura 5). Por exemplo, grupamentos carboxílicos (-COOH) respondem ao aumento de pH com a desprotonação do ácido, formando o ânion carboxilato (COO⁻). Assim, em pHs inferiores ao pKa, o grupamento se encontrará majoritariamente protonado, o que forma uma maior quantidade de ligações de hidrogênio na matriz do hidrogel, aproximando as cadeias poliméricas e dificultando o processo de intumescimento. Quando em pHs superiores ao pKa, ocorrerá a sua desprotonação, e com o aumento na quantidade de ânions na matriz polimérica do hidrogel, observa-se um efeito de repulsão eletrostática entre as cadeias, facilitando assim o processo de intumescimento (Figura 5A - DERAKHSHANKAH et al. 2022; ZHU et al. 2022).

Para hidrogéis que possuem em sua matriz tridimensional polimérica grupamentos amina (-NH₂), o abaixamento do pH permitirá a formação de íon amônio (-NH₃⁺). Assim em pHs inferiores ao pKa do grupamento, o hidrogel se torna um material catiônico e a presença de cargas positivas na matriz polimérica causará uma repulsão eletrostática entre as cadeias do hidrogel, afastando-as e, conseqüentemente, facilitando o intumescimento. Com o aumento do pH da solução, ocorrerá a desprotonação dos íons amônio, diminuindo assim a repulsão eletrostática e aumentando as ligações de hidrogênio na matriz. Com o aumento destas ligações de hidrogênio, as cadeias poliméricas do hidrogel tendem a se aproximar, dificultando o intumescimento (Figura 5B) (GAURI et al. 2022; PELLÁ et al, 2020).

Figura 5. Comportamento de hidrogéis pH-responsivos contendo grupos (A) ácido carboxílico -COOH e (B) amina -NH₂.



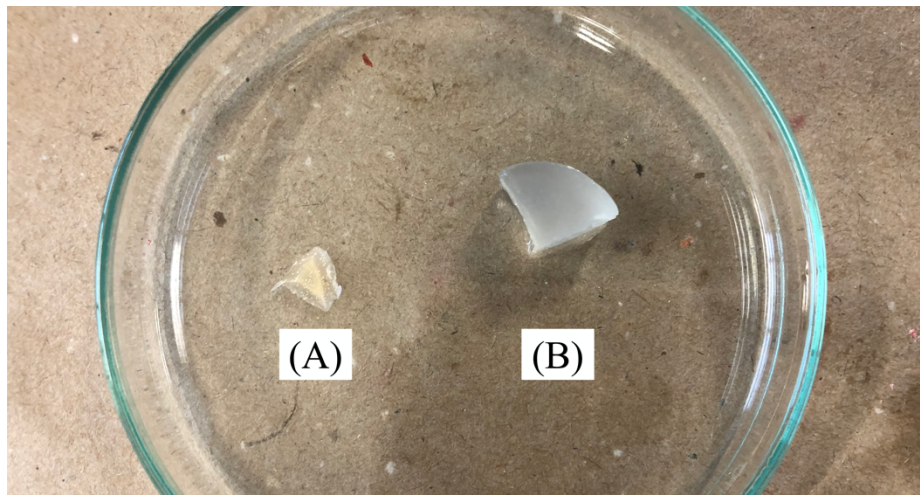
Fonte: adaptado de Chen et al. (2018).

2.2 MECANISMOS DE INTUMESCIMENTO

A capacidade dos hidrogéis em absorver água e assim intumescer fornece ao material um aspecto vítreo quando seco ou desidratado e elástico quando intumescido (PEPPAS & COLOMBO, 1997). A Figura 6, em que (A) apresenta o aspecto de um hidrogel a base de goma xantana (50,0 mg de GXm e 0,150 mL de DMA) na sua forma seca e em (B) na sua forma

intumescida. Como já mencionado, a capacidade de intumescer ou absorver fluídos pode ser alterada com estímulos externos devido a presença de grupos funcionais na estrutura da matriz polimérica, como por exemplo os grupamentos $-NH_2$, $-COOH$ e $-SO_3H$. Estes grupos podem ser modificados física ou quimicamente de forma a melhorar ou moldar a resposta a estímulos externos (JIANG et al., 2020).

Figura 6. Intumescimento de um hidrogel. Hidrogel de GX seco (A) e hidrogel após 25 horas de intumescimento (B).



Fonte: a autora.

O grau de intumescimento, ou simplesmente GI, é a forma na qual se expressa a massa de fluído absorvido pela matriz polimérica do hidrogel em um determinado intervalo de tempo, em relação à massa do hidrogel seco ($g\ g^{-1}$). A equação I é a equação utilizada para se determinar o valor de GI, em que m_t representa a massa do hidrogel intumescido em um determinado tempo e m_0 representa a massa inicial da amostra seca, ou a massa do hidrogel no início dos ensaios de absorção (PEPPAS & COLOMBO, 1997).

$$GI = \frac{m_t - m_0}{m_0} \quad (I)$$

Os mecanismos de absorção de fluídos por meio de uma rede polimérica podem ser previstos utilizando modelos de difusão Fickiana e não-Fickiano a partir da equação modificada da Lei da Potência (equação II), em que k é representado por uma constante de proporcionalidade e n é um expoente de difusão. Os valores de m_t e m_∞ correspondem às massas

de água ou fluido absorvidos pelo hidrogel em determinado tempo de ensaio, e no equilíbrio de intumescimento, respectivamente (PEPPAS & COLOMBO, 1997).

$$\frac{m_t}{m_\infty} = kt^n \quad (\text{II})$$

Materiais de diferentes formas físicas, como por exemplo hidrogéis em filmes, discos, cilindros ou esferas podem apresentar uma mudança no mecanismo de transporte do fluido. Para definir o mecanismo de transporte, através da Lei da Potência, podemos utilizar o valor do expoente de difusão (n) para caracterizar o modelo cinético como sendo governado, predominantemente por difusão fickiana, relaxação macromolecular, ou transporte anômalo. A Tabela 3 apresenta uma relação entre os valores tabelados do expoente de difusão para materiais com geometria cilíndrica (como os desenvolvidos neste presente trabalho), e seu respectivo modelo de difusão (PEPPAS & COLOMBO, 1997).

Tabela 3. Mecanismos de transporte para o modelo da Lei de Potência para materiais com geometria cilíndrica.

| Expoente de difusão (n) | Mecanismo de Transporte |
|-----------------------------|--------------------------|
| 0,45 | Difusão Fickiana |
| $0,45 < n < 0,89$ | Transporte anômalo |
| 0,89 | Relaxação macromolecular |

Fonte: adaptado de LIMA-TENÓRIO et al., 2015.

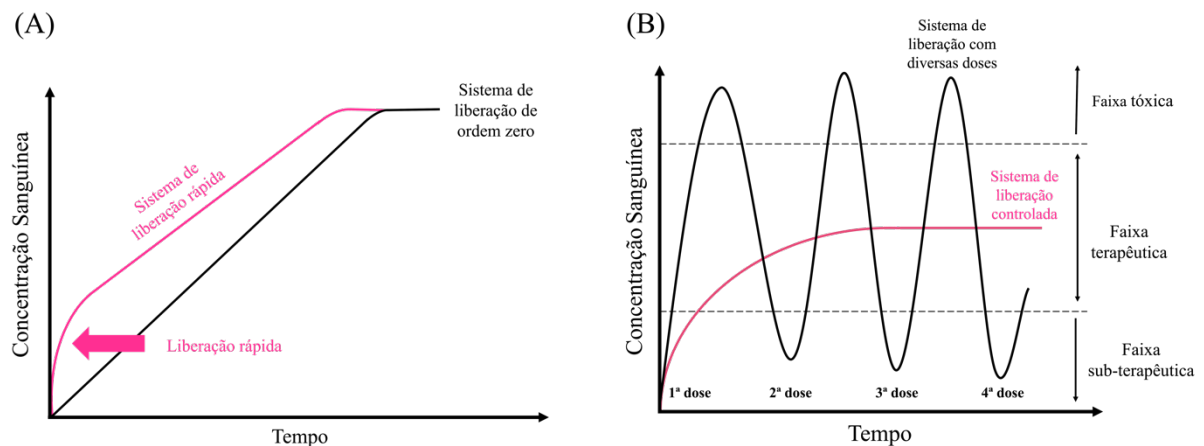
A difusão Fickiana é caracterizada por um intumescimento controlado pela difusão. No caso da relaxação macromolecular, a entrada do fluido ocorre pelo afastamento das cadeias poliméricas do hidrogel, podendo ser denominado também como Transporte de Caso II. O transporte anômalo pode ser caracterizado por um mecanismo em que a relaxação macromolecular e a difusão Fickiana ocorrem concomitantemente. Outro mecanismo existente é o Super Caso II de Transporte, em que além da difusão e da relaxação macromolecular, ocorre também a erosão das cadeias poliméricas do material (LIMA-TENÓRIO et al., 2015, PEPPAS & COLOMBO, 1997).

2.3 APLICAÇÃO DE HIDROGÉIS POLIMÉRICOS NA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Hidrogéis são materiais que, quando sintetizados a partir de materiais atóxicos e biocompatíveis, podem ser aplicados em sistemas de liberação controlada de fármacos, neste contexto, hidrogéis pH-responsivos tem grande apelo. (LI et al. 2019).

O processo de liberação de fármacos pode ocorrer basicamente de duas maneiras: a liberação rápida e a liberação controlada (Figura 7). A liberação rápida ocorre quase instantaneamente, sendo que a maior porcentagem ocorre nos tempos iniciais. Este mecanismo é efetivo para fármacos que necessitem de uma liberação rápida para sua ação, sendo para fármacos ministrados em doses únicas que necessitem de uma ação instantânea no organismo. A liberação controlada, por sua vez, permite que o fármaco seja liberado em pequenas quantidades ao longo do tempo, diminuindo o número de doses que o paciente deve utilizar e produzindo, portanto, uma resposta terapêutica melhor. A metodologia de liberação de fármaco deve ser adequada de acordo com as necessidades da droga a ser utilizada. (HUANG & BRAZEL, 2001; LI et al. 2019)

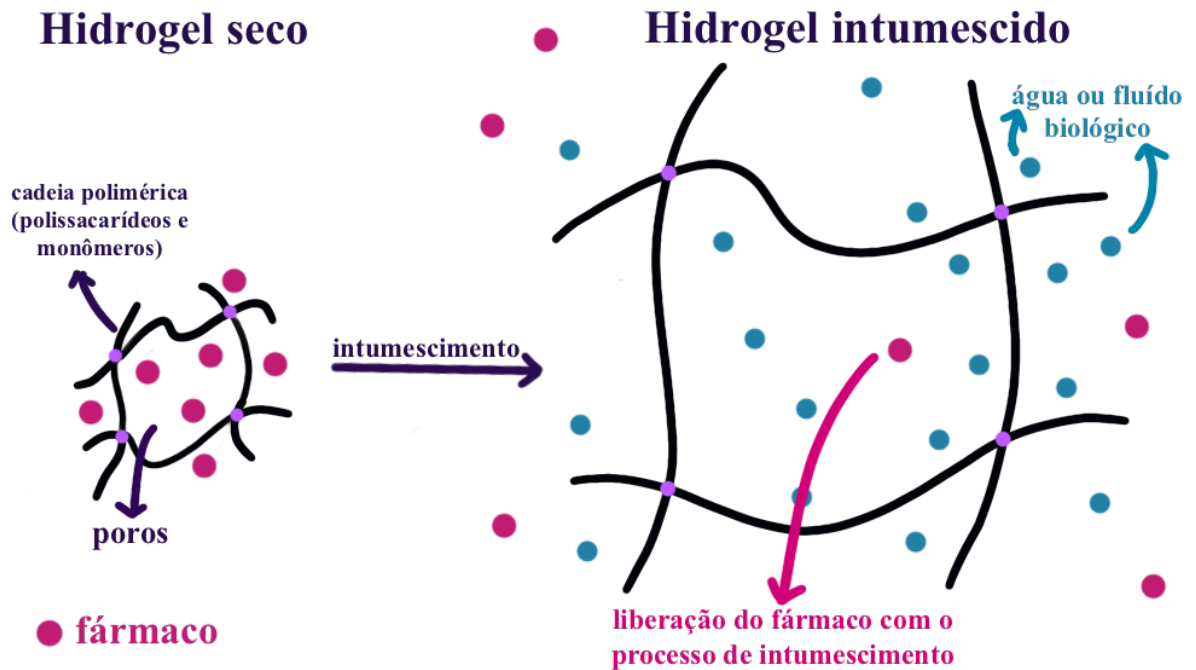
Figura 7. Modelo de liberação de fármacos: (A) liberação rápida e (B) liberação controlada.



Fonte: adaptado de HUANG & BRAZEL (2001) e LEE & YEO (2015).

Em se tratando de hidrogéis, visando a liberação controlada de fármacos, quando a matriz polimérica se encontra em contato com um solvente termodinamicamente compatível, ocorre o intumescimento com a liberação do fármaco inserido nos poros do hidrogel, como representado na Figura 8. A representação macroscópica deste fenômeno pode ser observada pelo intumescimento do material (COLOMBO, 1993).

Figura 8. Representação da liberação de fármaco a partir da matriz polimérica do hidrogel, como resultado do seu processo de intumescimento.



Fonte: a autora.

A cinética de liberação de fármacos é governada pelos fenômenos do intumescimento do hidrogel e da dissolução do fármaco. Para esta finalidade de entrega do fármaco por via oral, o material normalmente é utilizado na forma seca, em que as cadeias poliméricas da rede tridimensional estão aproximadas, sem fluídos e contendo apenas o fármaco em sua matriz. Assim, com a entrada do fluído, a droga contida nos poros do hidrogel é liberada. Além de poder apresentar propriedades biocompatíveis, os hidrogéis são materiais que podem ter suas propriedades manipuladas de acordo com a sua formulação.

A alteração da densidade de ligações de reticulação que formam a matriz polimérica, bem como da densidade de cadeias poliméricas pode implicar na alteração da capacidade de absorção de fluídos do material e, conseqüentemente, modificar a cinética de intumescimento e de liberação do fármaco. Outro fator que pode influenciar diretamente o local de entrega do fármaco é a capacidade de resposta a estímulos externos de um hidrogel, como por exemplo a termo- e pH-responsividade do material. A presença de grupos funcionais que podem ser ionizáveis pode alterar a resposta de intumescimento do hidrogel, conseqüentemente afetando

o perfil de liberação da molécula inserida nos poros da matriz (JIANG et al., 2020; LEE, 1985; THEODORAKIS et al., 2021).

Diferentes polímeros podem ser utilizados na síntese de hidrogéis para liberação controlada de fármacos. Adrover et al. (2019) sintetizaram hidrogéis baseados em goma gelana, um polissacarídeo natural, para a liberação de teofilina e cianocobalamina. O material sintetizado apresentou pH-responsividade e foi efetivo ao liberar os fármacos modelos de modo controlado, de forma que a mudança da formulação do hidrogel levou à alteração do tempo de liberação. Um material polimérico biocompatível e pH-responsivo foi sintetizado por Ghauri et al. (2022) baseado em quitosana, alginato de sódio e polietileno glicol (PEG) para a liberação de ceftriaxona sódica, de forma que a liberação ocorreu nos primeiros 30 minutos de ensaio em solução tampão ácida, indicando que este material foi efetivo para a liberação rápida no sistema estomacal simulado.

Além da liberação via oral, hidrogéis podem atuar como veículo de liberação de fármacos *in situ*, como o material sintetizado por Luo et al. (2022), que foi capaz de liberar diversos fármacos através de uma película de hidrogel que possui características mucoadesivas e anti-inflamatórias no tratamento de abrasão da córnea. Este material foi sintetizado utilizando 2-hidroxietil metacrilato, 2,2,-dietoxiacetofenona, trimetilolpropano trimetacrilato e nanopartículas de ZnO.

Nota-se que os materiais a serem empregados em *drug delivery* apresentam grande variedade, podendo ser alterados quanto à sua formulação, a resposta de estímulos externos, o local de liberação de fármaco e na variedade de materiais que podem liberar, podendo ser atribuídas propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias, conforme a necessidade de aplicação.

Para a liberação de vitamina B₁₂, hidrogéis pH-responsivos de diferentes formulações estão sendo estudados. Dentre as pesquisas realizadas, Ghorbanloo & Heidary (2017) sintetizaram um material a base de ácido poliacrílico e *N,N'*-metileno-bis-acrilamida para a liberação de vitamina B₁₂ na presença de ácido fólico. O hidrogel possui grupamentos -COOH, que conferem propriedades pH-responsivas, de forma que apresentaram um GI significativamente maior em pH 7,4, quando comparado aos ensaios em pH 1,1. O uso desta formulação permitiu que os autores liberassem o fármaco em pH intestinal, sendo dependente também, neste caso, da concentração de ácido fólico utilizado na solução tampão.

Gucchait e colaboradores (2021) utilizaram materiais anfifílicos a base de tripeptídeos para sintetizar hidrogéis pH-responsíveis com grupamentos de ácido carboxílico (-COOH) que

possui um perfil de intumescimento que permite uma maior liberação da vitamina B₁₂ em pH 7,46.

Pérez-Salinas et al. (2016) sintetizaram hidrogéis baseados em 2-hidroxietil metacrilato e etilenoglicol dimetacrilato com diferentes porosidades e avaliaram a quantidade de vitamina B₁₂ capaz de ser inserida em sua matriz polimérica, bem como a liberação desta em pH 7,4. Semelhante aos outros materiais citados, também apresentou como grupamento pH-responsivo o ácido carboxílico, o que promove um maior intumescimento do hidrogel em pHs mais altos em relação ao pKa do ácido, devido à desprotonação (-COO⁻) dos grupos funcionais e afastamento das cadeias poliméricas.

2.4 POLISSACARÍDEOS

Polissacarídeos são os polímeros orgânicos mais abundantes obtidos via fontes naturais, sendo quimicamente compostos por unidades monoméricas ou monossacarídicas associadas por ligações glicosídicas. Por possuírem normalmente uma natureza hidrofílica, estes polímeros podem formar soluções viscosas ou gelificantes, recebendo por este motivo as denominações de goma ou hidrocolóides. As propriedades físico-químicas dos polissacarídeos mostram-se dependentes de sua composição química natural, mas também de processos de extração e processamento sofridos. (AHMAD et al., 2019; MOHAMMADINEJAD et al, 2020).

Os biomateriais estão sendo propostos como alternativa a materiais de origem sintética, já que estes são provenientes de fontes renováveis e possuem características físico-químicas favoráveis, como a sua solubilidade em meio aquoso, biocompatibilidade, ausência de toxicidade e capacidade de retenção de água. Estas propriedades permitem que as gomas sejam aplicadas na indústria alimentícia como estabilizantes, gelificantes, emulsificantes e modeladores de textura, formato e efeitos sensoriais dos alimentos. As gomas também possuem capacidade de serem precursoras na síntese de materiais para o encapsulamento de diferentes materiais e de produzir filmes ou géis, despertando também o interesse das indústrias biomédica e farmacológica como na liberação de fármacos, desenvolvimento de curativos e na engenharia de tecidos.

A presença de diferentes grupos funcionais confere aos polissacarídeos diversas propriedades físico-químicas, como a já mencionada capacidade de formar filmes e géis físicos através das interações intermoleculares, tais como interações iônicas e ligações de hidrogênio. Para a formação de hidrogéis e filmes químicos a partir de polissacarídeos, porém, é necessária

a modificação química da estrutura do biopolímero, como a inserção de grupamentos vinílicos passíveis de sofrerem uma reação de polimerização (MOHAMMADINEJAD et al., 2020).

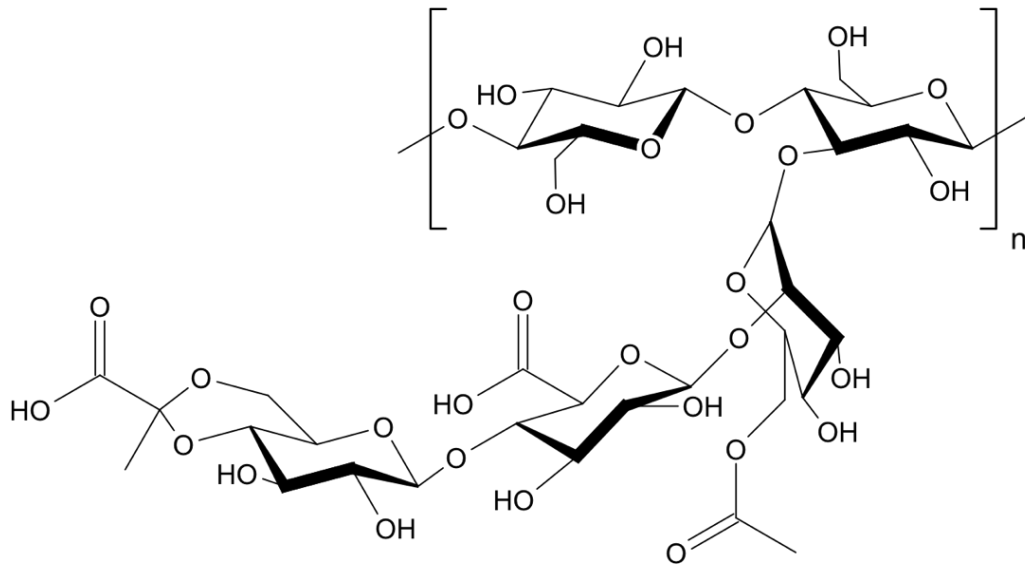
As gomas podem ser classificadas de acordo com sua possível aplicação, origem, linearidade de cadeia e presença de carga iônica. A estrutura química confere às gomas a capacidade de diminuir a tensão interfacial entre diferentes estruturas, resultando em uma estabilidade por meio de interação estérica, eletrostática e interações hidrofílicas (AHMAD et al., 2019).

2.4.1 Goma Xantana

A goma xantana (GX) é um biopolímero utilizado na indústria devido às suas propriedades de atoxicidade, biocompatibilidade e capacidade de crescimento celular. Bastante utilizada na indústria alimentícia, é um componente estabilizante, emulsificante e espessante, já que possui alta viscosidade, boa estabilidade em diversos pHs, boa solubilidade em água a baixas e altas temperaturas, e resistência à degradação enzimática. Além da indústria alimentícia, a GX é utilizada na medicina, farmácia, agricultura, biomedicina, tratamento de efluentes e como inibidor de corrosão (BUENO et al., 2013; ELELLA et al., 2021; GUMUS et al., 2010).

A GX é produzida por bactérias gram-negativas denominadas *Xanthomonas campestris*, que se associam a plantas, mais comumente cana de açúcar ou milho. Estas bactérias utilizam a glucose como principal fonte de carbono para a síntese aeróbica do polissacarídeo. A estrutura química da GX (Figura 9) pode ser descrita por uma glucana como cadeia principal, onde as unidades de glucopiranosose estão unidas por ligações do tipo β -1,4. Ainda apresenta cadeias laterais ligadas aos carbonos 3 da cadeia principal. Estas cadeias são normalmente compostas por duas unidades de β -1,4-manose e uma unidade de β -1,2-ácido glucurônico. Ambos os resíduos de β -1,4-manose podem ainda estar quimicamente modificados, de forma que o resíduo ligado diretamente à glucose da cadeia principal apresenta-se *O*-acetilada em carbono 6 e o resíduo presente na extremidade da cadeia lateral encontra-se substituído por um grupamento acetal de ácido pirúvico envolvendo os carbonos 4 e 6. A presença de grupos ácidos na estrutura da GX confere a este biopolímero um caráter aniônico com um valor de pKa próximo a 4,5 (ELELLA et al., 2021; HAJIKHANI et al., 2019; PATEL et al., 2020).

Figura 9. Estrutura Química da Goma Xantana.



Fonte: adaptado de ELELLA et al., 2021.

Modificações químicas podem ser realizadas na estrutura na GX de forma a alterar suas propriedades e permitir que outras reações sejam possíveis. Por exemplo, a alquilação da GX pode alterar propriedades como a morfologia, as propriedades térmicas e a diminuição da viscosidade devido a desacetilação do polissacarídeo (SARA et al., 2020). A modificação química com acrilamida e trimetilpropano triglicidil éter permitiu que hidrogéis fossem sintetizados com uma melhor estabilidade térmica e uma estrutura mais porosa, capazes de serem aplicados na remoção do corante violeta cristal (ZHENG et al., 2019).

As propriedades da GX permitem que o biopolímero seja empregado em diversas aplicações, como a síntese de hidrogéis magnéticos com capacidade *self-healing* (SANO et al., 2021); substituindo lipídeos em alimentos para diminuir a porcentagem lipídica e aumentar estabilidade do colesterol durante o armazenamento de alimentos (RATHER et al., 2021); na formação de emulsões para o aumento da estabilidade e bioacessibilidade do flavonóide quercetina, um antioxidante natural (HUANG et al., 2021); e no clareamento de sucos de romã em associação com outros polissacarídeos, consequentemente diminuindo a quantidade de antocianinas e formação de turvação após o processo de pasteurização e durante o armazenamento (TÜRKYILMAZ, HAMZAOGLU & ÖZKAN, 2021).

Hidrogéis baseados em amido e GX foram sintetizados por Shalviri e colaboradores (2010) para a liberação de vitamina B₁₂. Os hidrogéis sintetizados apresentaram permeabilidade

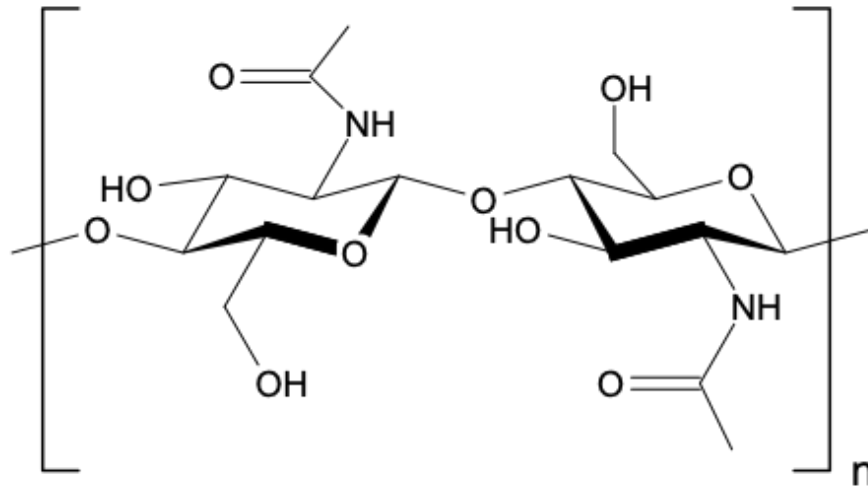
seletiva para fármacos de diferentes tamanhos e carga. Em fármacos de carga negativa, a repulsão eletrostática entre a cadeia polimérica do hidrogel e a molécula do fármaco pode dificultar a encapsulação do material, porém pode facilitar a liberação. Os hidrogéis com maior quantidade de GX em sua composição apresentaram uma maior pH-responsividade, intumescendo mais em pHs entre 4,0 e 8,0, sendo passível de liberar o fármaco em ambiente intestinal.

2.4.2 *Quitosana*

A quitosana (QTS) é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação do biopolímero natural quitina (QT). A QT está presente como um elemento estrutural no exoesqueleto de diversos seres vivos, como crustáceos, insetos, fungos e leveduras, sendo um polissacarídeo natural abundante (KRITCHENKOV et al. 2021; YOUNES, RINAUDO, 2015). A maior fonte de QT comercial são as cascas de caranguejo e de camarão, e sua extração é realizada a partir de um tratamento com solução diluída de ácido clorídrico para a desmineralização do material seguida de um tratamento com solução diluída de hidróxido de sódio, a fim de eliminar proteínas presentes na QT. Considerando se tratar de um material de origem natural, um posterior tratamento de descoloração pode se tornar necessário, obtendo-se a QT na forma pura, sem odores ou pigmentos (BEGUM et al., 2021; YOUNES, RINAUDO, 2015; ZARGAR, ASGHARI & DASHTI, 2015). Cerca de 10^{12} – 10^{14} toneladas de QT são produzidas por ano a partir de fontes marinhas. Quando extraída de crustáceos ou fungos, pode exibir maior capacidade de eliminação de radicais livres e, associado ao seu caráter biocompatível, atóxico, bioabsortível, além de possuir uma certa similaridade química com os glicosaminoglicanos, (componentes do tecido conjuntivo), a QT pode ser empregada em diversos setores industriais, produzindo materiais com diferentes características e aplicações (CHENG et al., 2021 PAULA, PAULA & FEITOSA, 2018).

A estrutura química da QT (Figura 10) é comparável à estrutura da celulose, em que o polímero é formado por monômeros de β -*N*-acetil-D-glucosamina, podendo ser encontrada em formas alomórficas distintas, o que altera a solubilidade do polissacarídeo (JOSEPH et al., 2021; SIGH R. et al., 2021; ZARGAR, ASGHARI & DASHTI, 2015).

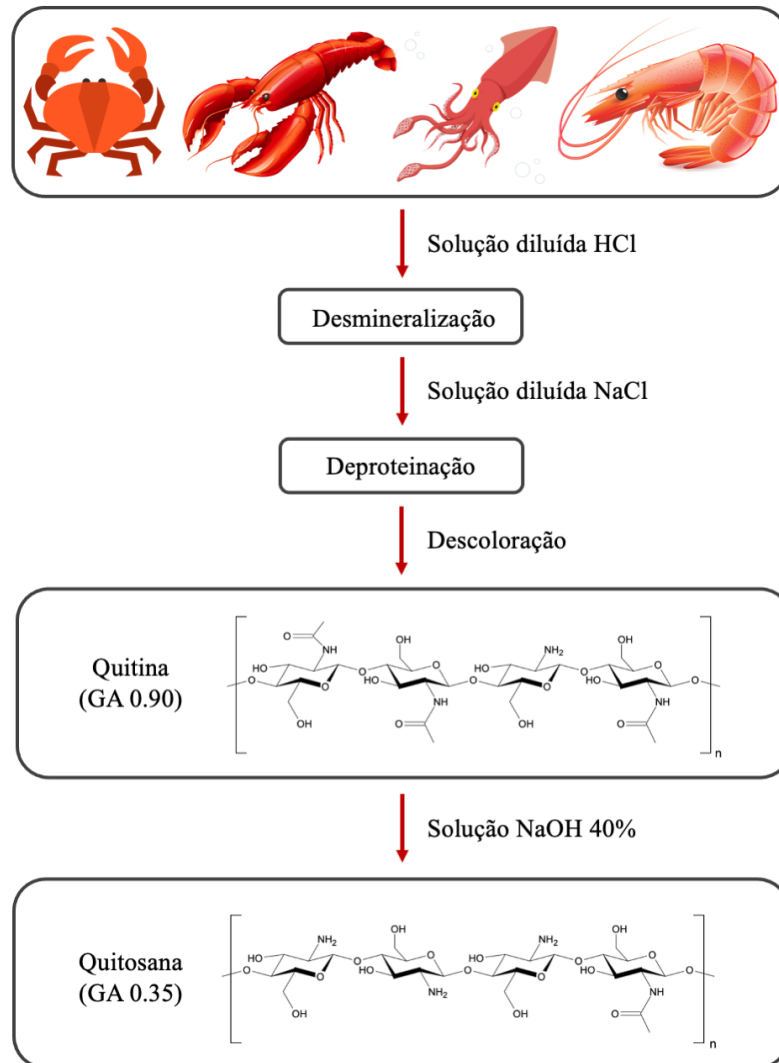
Figura 10. Estrutura química da Quitina.



Fonte: adaptado de BEGUM et al., 2021.

A QTS é um polímero obtido pela reação de desacetilação da QT (Figura 11). A característica que define se o biopolímero estudado se refere à QT ou à QTS é o grau de desacetilação (GD), ou seja, a quantidade de resíduos de β -1,4-D-glucosamina no polissacarídeo. Para a molécula de QTS, este valor pode variar entre $0 < GD < 0,5$. Sua forma desacetilada confere ao material características químicas distintas, como o aumento da solubilidade do biopolímero em soluções aquosas levemente ácidas, alta porosidade, e uma estrutura única, já que o GD da QTS bem como suas propriedades físico-químicas podem variar (HANNA, et al., 2020; JOSEPH et al., 2021, ZARGAR, ASGHARI & DASHTI, 2015).

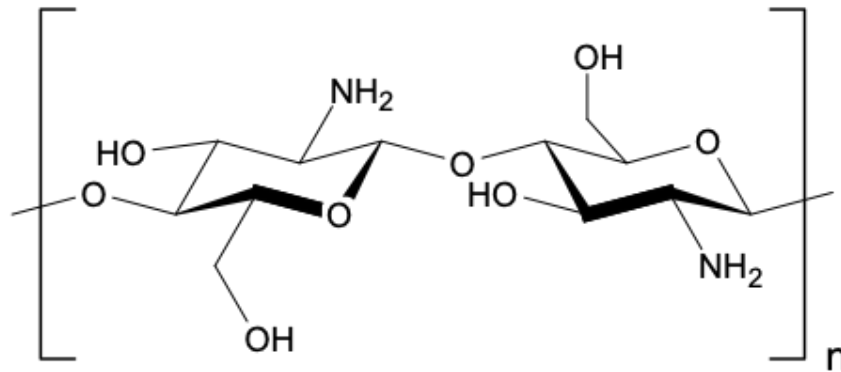
Figura 11. Obtenção da Quitosana.



Fonte: adaptado de ZARGAR, ASCHARI & DASHTI, 2015.

O biopolímero QTS possui em sua estrutura resíduos de β -1,4-D-glucosamina (Figura 12), apresentando grupos funcionais reativos, como grupamentos amina em C2 e hidroxilas livres em C3 e C6. Sendo um polissacarídeo catiônico básico com pKa de aproximadamente 6,3, apresenta características pH-responsivas, é hidrofílico e apresenta capacidade de adsorção de água. Os sítios reativos permitem que a QTS seja funcionalizada a partir de modificações químicas, como a fosforização, alquilação, carboximetilação e reações de polimerização cruzada. As modificações químicas podem alterar propriedades como a solubilidade e a reatividade da QTS, aumentando sua diversidade de aplicações (AYCAN, D., ALEMDAR, N., 2018; JOSEPH et al., 2021; ZHANG et al., 2020).

Figura 12. Estrutura química da Quitosana.



Fonte: adaptado de BEGUM et al., 2021.

A reação de desacetilação da QT pode ser realizada tanto em meio ácido como em meio básico, porém a rota de síntese preferencial é via meio básico com solução de hidróxido de sódio (NaOH), já que as ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ são suscetíveis à hidrólise ácida. A solubilidade do polímero pode ser caracterizada pela fração de β -N-acetil-D-glucosamina, bem como a distribuição de grupos N-acetil na estrutura. Estas características são alteradas dependendo da rota de desacetilação escolhida; por exemplo, a temperatura, o tempo de reação e a concentração da solução de NaOH podem afetar no GD do produto (YOUNES & RINAUDO, 2015). A QTS apresenta propriedades interessantes para aplicações tecnológicas, como a capacidade de formar filmes, atuação como agente de floculação, alta viscosidade, capacidade de formação de sais com ácidos orgânicos e inorgânicos, ausência de toxicidade e propriedades biológicas como biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioatividade, mucoadesão, atividade antimicrobiana, antitumoral, propriedade antiácida, hipolipemiante (diminuição do colesterol), anticoagulante e possui ainda a capacidade de carrear diferentes fármacos (BAGHER, et al., 2020; KHORASANI, KOUHFAR & SHOJAOSADATI, 2021; ZARGAR, ASGHARI & DASHTI, 2015).

Estas propriedades da QTS permitem que o biopolímero seja aplicado em diversos ramos da ciência e tecnologia, como por exemplo na química ambiental, para a adsorção de metais pesados como As, Cr, Pb, Cd, Hg, Cu e Zn em águas naturais (BEGUM et al., 2021), como floculante magnético para a remoção e recuperação de íons de Cu²⁺ de água de esgotos (SUN et al., 2021) e para a síntese de aerogel para a remoção do corante têxtil *Reactive Black 5* (EL-ZAWAHRY et al., 2021). Também pode ser aplicado na agroindústria como hidrogel

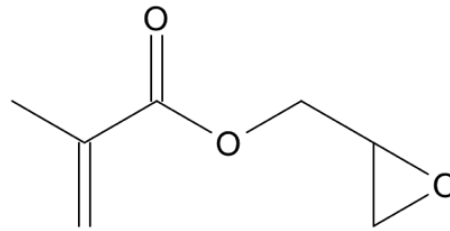
para liberação controlada de pesticida organofosforado (BHULLAR et al., 2021), agroquímico como alternativa sustentável na proteção de colheitas (MALUIN & HUSSEIN, 2020) e como bioestimulador para o crescimento de vegetais como fonte natural de nitrogênio (KURAPINA et al., 2020). Na área da biotecnologia, a QTS pode ser utilizada para a detecção de proteínas no diagnóstico de câncer de mama (NASROLLAHOPOUR et al., 2021), compostos combinados com osso humano para o auxílio da regeneração óssea (KOWALCZYK et al., 2021) e na síntese de hidrogéis termossensíveis para liberação local de senidazol, um fármaco para tratamento de infecções vaginais (ARGENTA et al., 2021).

Para a liberação de vitamina B₁₂, há poucos estudos de hidrogéis baseados em QTS. Pellá e colaboradores (2020) sintetizaram um microhidrogel baseado em QTS, em que a vitamina B₁₂ foi encapsulada e submetida a testes de liberação em pH 1,2 e 7,4. O hidrogel apresentou carga positiva em pHs ácidos, já que a QTS possui grupamentos amina com pK_a de aproximadamente 6,3. Esta carga positiva é proveniente de grupamentos amina protonados (-NH₃⁺), que promovem a repulsão eletrostática das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, um maior intumescimento. A vitamina B₁₂ apresentou um perfil de liberação rápida nos dois pHs testados, porém se tornando mais controlada em pH 7,4. Os autores sugeriram uma interação entre o fármaco e a matriz do hidrogel, controlando a liberação neste pH.

2.4.3 *Modificação Química de polissacarídeos com Metacrilato de Glicidila*

O mecanismo de síntese de hidrogéis químicos via reação de polimerização via radicalar, metodologia empregada neste trabalho, necessita da presença de grupamentos vinílicos na estrutura dos monômeros utilizados. No caso da GX e QTS, para que as reações de polimerização entre as cadeias macromonoméricas ocorressem, os polissacarídeos devem ser previamente modificados mediante a inserção de grupamentos metacrilato, a partir de uma reação de adição nucleofílica nas hidroxilas disponíveis, utilizando o reagente metacrilato de glicidila, ou GMA (Figura 13).

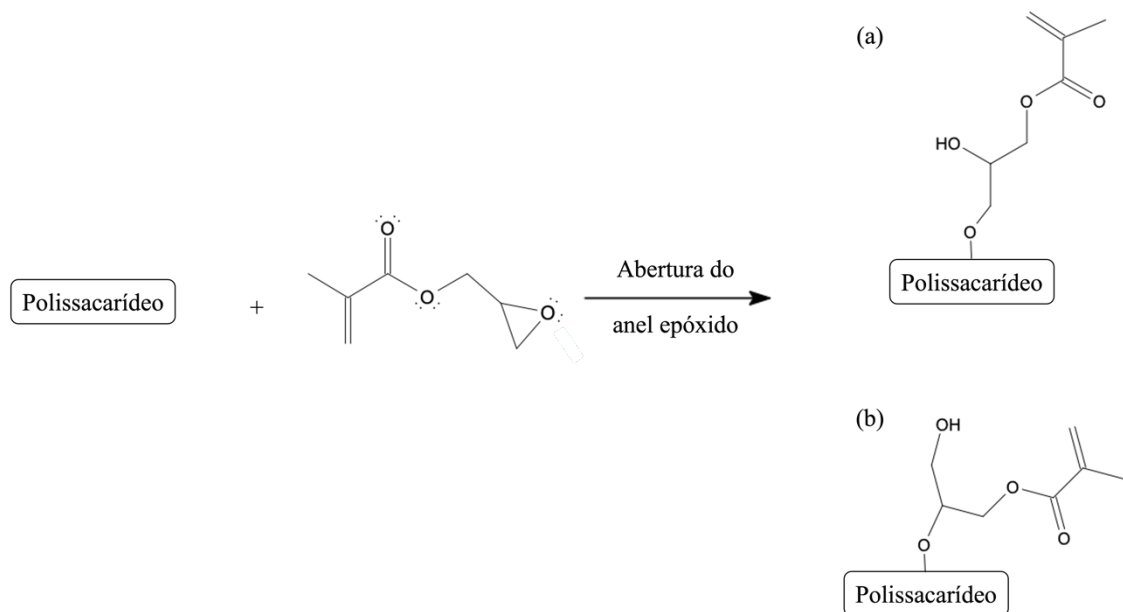
Figura 13. Estrutura química do metacrilato de glicidila (GMA).



Fonte: adaptado de REIS *et al.* 2009

A reação de modificação pode acontecer a partir de duas rotas sintéticas, sendo uma reação de transesterificação ou a abertura do anel epóxido do GMA. O mecanismo de reação depende do pH do meio reacional, de tal forma que, em meio básico as duas reações ocorrem simultaneamente, porém em pH ácido, a reação via abertura do anel epóxido é favorecida (REIS *et al.* 2009). A modificação via a abertura de anel epóxido gera os dois produtos ilustrados na Figura 14, ou seja, 3-metacrilóil-1-gliceril éter de polissacarídeo (a) e 3-metacrilóil-2-gliceril éter de polissacarídeo (b).

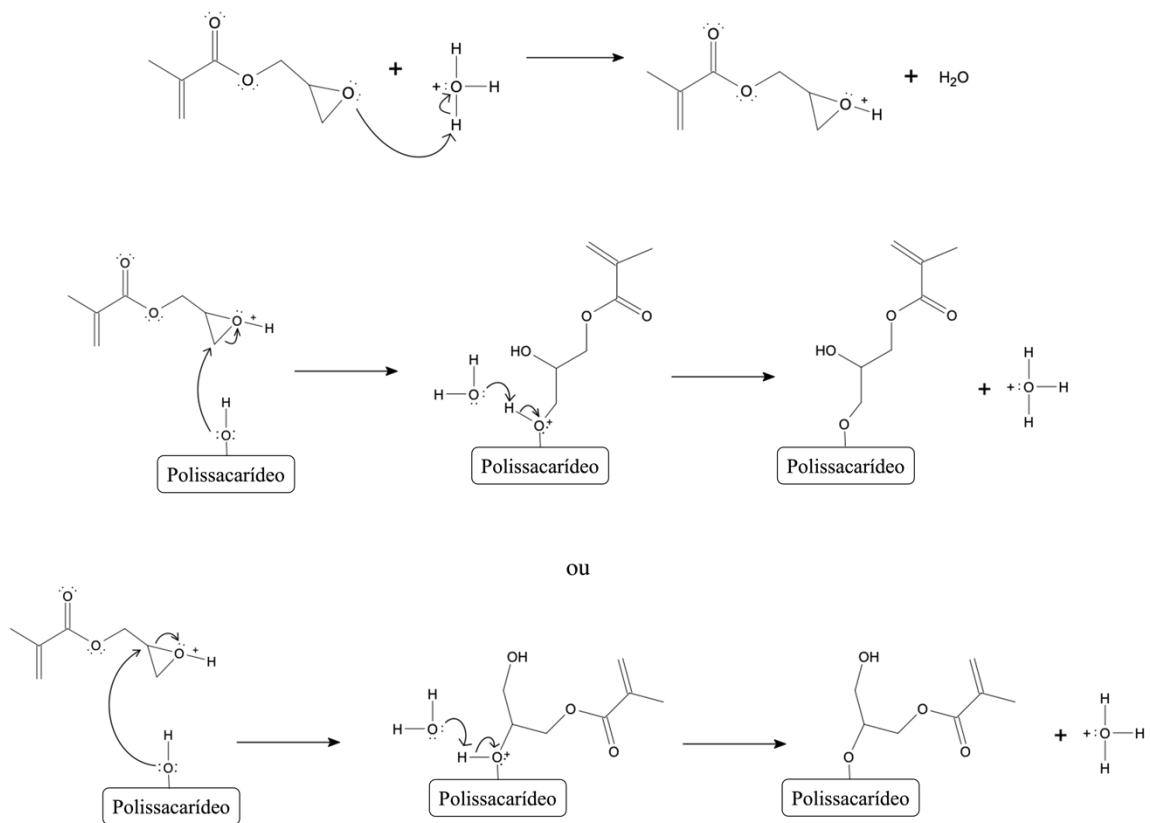
Figura 14. Produtos da reação de modificação do polissacarídeo com GMA: 3-metacrilóil-1-gliceril éter de polissacarídeo (a) e 3-metacrilóil-2-gliceril éter de polissacarídeo (b).



Fonte: adaptado de REIS *et al.* 2009.

O mecanismo de reação de modificação em meio ácido, ilustrado na Figura 15, pode ser descrito por uma reação de adição nucleofílica. O oxigênio do anel epóxido do GMA é protonado, facilitando que as hidroxilas presentes nos monômeros do polissacarídeo realizem um ataque nucleofílico em C1 (gerando como produto o 3-metacrilóil-1-gliceril éter de polissacarídeo) ou C2 (3-metacrilóil-2-gliceril éter de polissacarídeo) do GMA, com a abertura do anel epóxido (REIS *et al.* 2009).

Figura 15. Representação do mecanismo geral da reação de modificação química de um polissacarídeo com GMA.



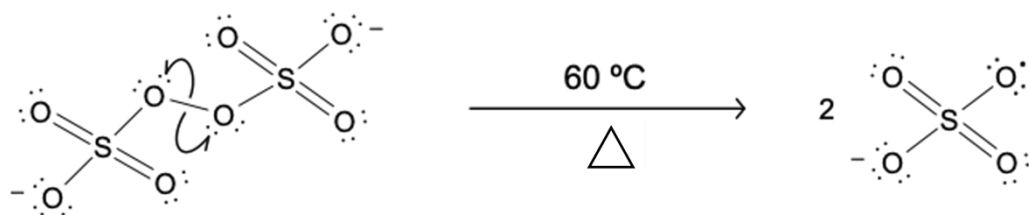
Fonte: adaptado de REIS *et al.* 2009

A reação não é estereoseletiva, de forma que ocorre a formação dos dois produtos em uma mistura racêmica. Esta reação ocorre facilmente nas condições descritas, com aquecimento e uso de ácido acético como catalisador, permitindo que os produtos da modificação possuam um grupo vinílico necessário para posterior reação de polimerização via radicalar.

2.5 FORMAÇÃO DE HIDROGÉIS POLIMÉRICOS BASEADOS EM POLISSACARÍDEOS

A síntese de hidrogéis ocorre a partir da reação de polimerização envolvendo os macromônmeros (polissacarídeos modificados com GMA) e outros monômeros espaçadores que podem estar presentes no meio reacional. Esta reação ocorre via mecanismo radicalar, de forma que o iniciador persulfato (Figura 16) sofre clivagem com aquecimento do sistema a 60 °C, formando dois radicais sulfato que atuam como iniciador de polimerização.

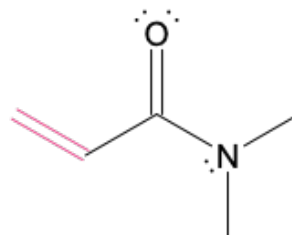
Figura 16. Formação de radicais livres por meio de clivagem do persulfato de potássio.



Fonte: a autora.

Após a clivagem do persulfato, a formação do radical dará sequência à propagação de mais radicais, iniciando o ataque às duplas ligações de grupos vinílicos presentes, tanto nos monômeros espaçadores (DMA, Figura 17), como nos polissacarídeos modificados com GMA. O monômero espaçador utilizado neste trabalho foi o *N,N*-dimetil-acrilamida (DMA), o qual não apresenta carga elétrica, mas apresenta em sua estrutura um grupamento vinílico passível de sofrer a reação.

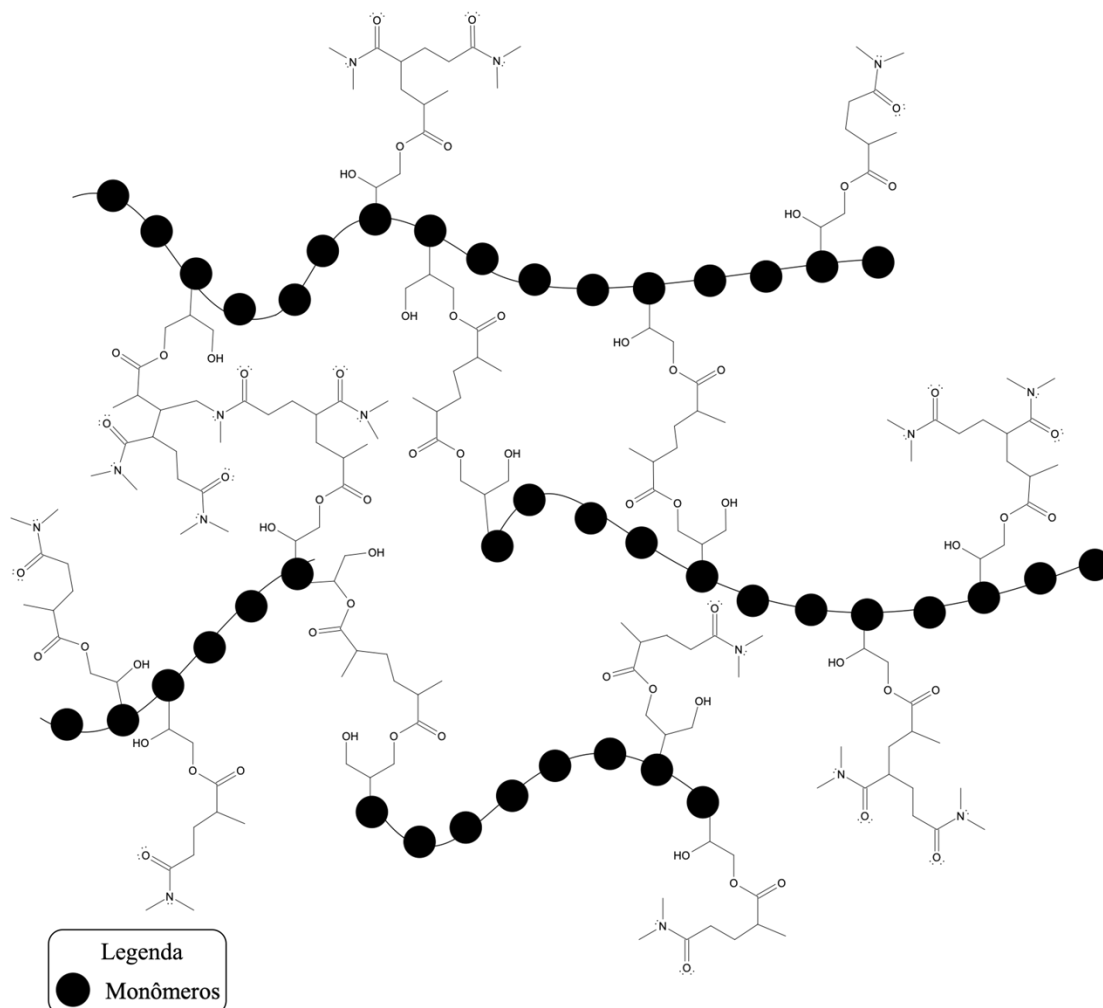
Figura 17. Estrutura do monômero espaçador *N,N*-dimetil-acrilamida ou DMA.



Fonte: adaptado de LIMA-TENÓRIO *et al.* (2015).

Na formação do hidrogel polimérico, as duplas ligações são polimerizadas formando uma rede tridimensional, o que caracteriza a formação do material. Esta polimerização origina poros que são capazes de abrigar as moléculas de água ou fluídos absorvidos pelo hidrogel. A estrutura dos hidrogéis formados pela adição de polissacarídeos modificados com GMA e DMA está representada na Figura 18.

Figura 18. Representação esquemática da estrutura da matriz tridimensional polimérica de um hidrogel baseado em polissacarídeo e DMA.



Fonte: a autora.

3 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA E HIPÓTESES

Visando a criação de um dispositivo pH-responsível, potencialmente atóxico e biocompatível capaz de ser empregado em sistemas de liberação controlada de vitamina B₁₂, foram desenvolvidas diferentes formulações de hidrogéis a base de goma xantana ou quitosana, utilizando-se o DMA como monômero espaçador. A escolha por estes dois modelos de polissacarídeos se deu em virtude de seus diferentes grupos ionizáveis e potenciais comportamentos pH responsivos. Para a liberação da vitamina B₁₂ em sistema gastrointestinal simulado, é necessário que se desenvolva uma formulação cujo maior grau de intumescimento se dê em solução intestinal simulada, ou seja, em pH 6,8.

Esta vitamina é um cofator enzimático essencial no metabolismo humano e está presente nas rotas metabólicas de síntese de proteínas, DNA, hemácias e para auxiliar na formação de energia (ATP). É absorvida no intestino, sendo que sua deficiência pode gerar quadros de anemia ou problemas neurológicos. Desta forma, a caracterização dos mecanismos de intumescimento é necessária afim de se avaliar as potencialidades de cada material desenvolvido para uma possível liberação controlada de fármaco.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Sintetizar e caracterizar hidrogéis baseados em goma xantana e quitosanal visando a aplicação desses materiais na liberação controlada, *in vitro*, de vitamina B₁₂.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a modificação química dos polissacarídeos GX e QTS com metacrilato de glicidila (GMA);
- Sintetizar hidrogéis químicos a partir dos polissacarídeos modificados GX e QTS.
- Caracterizar físico-quimicamente os hidrogéis produzidos;
- Estudar o mecanismo de transporte de água nos hidrogéis sintetizados;
- Avaliar se os hidrogéis sintetizados apresentam características pH-responsivas;
- Selecionar a formulação de hidrogel que apresente as melhores características físico-químicas para liberação controlada de Vitamina B₁₂;
- Realizar ensaios de liberação de Vitamina B₁₂ em sistema gastrointestinal simulado (*in vitro*).

5 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS BASEADOS EM QUITOSANA

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 *Material*

- Reagentes: Quitosana de baixa massa molecular (Sigma-Aldrich), metacrilato de glicidila 97 % (Sigma-Aldrich), N,N'-dimetilacrilamida 99% (Sigma-Aldrich), ácido acético glacial 99,7 % (Perquim), etanol 95% (Perquim), persulfato de potássio (Dinâmica), hidróxido de sódio (Dinâmica), fosfato de potássio monobásico (Dinâmica), ácido clorídrico 37% (Realtech), cloreto de sódio (Neon).
- Equipamentos: agitador magnético, Liofilizador L202/Liotop. Espectrômetro Infravermelho FTIR (IRPrestige-21 com acessório de refletância difusa, DRS-8000/Shimadzu), Sistema Liquefator de Nitrogênio (StirLiN-1 Economy/Stirlin) – Equipamentos pertencentes ao C-Labmu (UEPG)

5.1.2 *Modificação química da quitosana*

A modificação química da QTS foi realizada em 500 mL solução de ácido acético glacial 0,4 mol L⁻¹, utilizando 2,5 g de QTS e 3,0 mL de GMA (metodologia adaptada de Reis et al., 2009). A solução foi aquecida a 70 °C e mantida sob agitação magnética por 24 h. A Quitosana modificada (QTSm) foi então precipitada com a basificação da solução com hidróxido de potássio até pH 10,0 e adição de etanol 95%. Em seguida, foi filtrada e seca a temperatura ambiente.

Os polissacarídeos nativo e modificado foram caracterizados quimicamente por análises de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), sendo a análise realizada com pastilha de KBr, em transmitância com resolução de 4 cm⁻¹, sendo o intervalo da análise entre 400 à 4000 cm⁻¹ com o acúmulo de 64 scans.

5.1.3 *Preparo e caracterização dos hidrogéis*

Os hidrogéis foram preparados a partir de uma reação de polimerização/reticulação via radicalar. Para tanto, o polissacarídeo QTSm, foram utilizados nas proporções mostradas na Tabela 4, juntamente com o agente espaçador N,N'-Dimetil acrilamida (DMA). Os hidrogéis foram sintetizados num volume final de 5,0 mL e utilizou-se solução de ácido acético 0,4 mol

L⁻¹ como solvente. Após a homogeneização da solução, 17,0 mg do iniciador persulfato de potássio foram adicionados para iniciar a reação de reticulação. Os hidrogéis foram então secos em estufa à ~50 °C.

Tabela 4. Formulações de hidrogéis a base de QTSm e DMA sintetizados.

| Formulação | QTSm (mg) | DMA (mL) |
|------------|-----------|----------|
| QTSA1 | 500,0 | 0,300 |
| QTSA2 | 500,0 | 0,500 |
| QTSA3 | 500,0 | 0,700 |
| QTSA4 | 500,0 | 1,500 |
| QTSA5 | 500,0 | 2,000 |
| QTSA6 | 500,0 | 2,500 |
| QTSB1 | 550,0 | 0,350 |
| QTSB2 | 550,0 | 0,550 |
| QTSB3 | 550,0 | 0,770 |

Fonte: a autora.

Para os resultados de GI, análises estatísticas foram realizadas a partir dos softwares Microsoft® Excel para Mac v. 16.56 em que n = 3. Para análise de resultados, foi utilizado o valor de GI dos hidrogéis quando atingiram o equilíbrio (massa constante) em ensaios com água destilada.

5.1.4 *Preparo de fluido gastrointestinal simulado*

O fluido gastrointestinal simulado foi preparado a partir de soluções padrões que simulam pH e força iônica, porém na ausência de enzimas presentes no sistema. Para o preparo das soluções, utilizou-se a metodologia relatada na United States Pharmacopeia (USP) e European Pharmacopeia (EP). Desta forma a solução gástrica simulada foi preparada a partir de uma solução tampão pH 1,2 utilizando as concentrações de 2,000 g L⁻¹ de NaCl e 2,917 g L⁻¹ de HCl, enquanto o fluido intestinal simulado foi preparado a partir de uma solução tampão pH 6,8 utilizando 0,616 g L⁻¹ de NaOH e 6,800 g L⁻¹ de KH₂PO₄.

5.1.5 *Ensaio de intumescimento*

Os ensaios de intumescimento em água destilada foram realizados por gravimetria a temperatura ambiente, onde o hidrogel seco teve sua massa aferida anteriormente ao ensaio. Após submerso em água destilada, a massa adquirida foi determinada em intervalos de tempo pré-definidos (15 a 20 minutos), tomando-se o cuidado de remover o excesso de água superficial, até não mais se observar alterações de massa, momento em que se considerou como estado de equilíbrio. Com base nos valores de massa calculou-se então o GI de acordo com a equação I.

A partir das informações de massa, foi possível também calcular o mecanismo de intumescimento através da equação II para cada formulação de hidrogel. Para este estudo de mecanismo, utilizou-se a Lei da Potência, de forma que o cálculo foi realizado considerando-se apenas a porção linear do perfil de intumescimento dos hidrogéis, ou seja, para o ajuste matemático foram utilizados apenas os valores até 60% do valor de GI no equilíbrio.

Os ensaios de intumescimento em fluido gastrointestinal simulado foram realizados com temperatura controlada de 37 °C em solução tampão de pH 1,2 e pH 6,8 durante 4h.

Os resultados foram analisados de acordo com o GI e o mecanismo de intumescimento foi determinado utilizando 60% do valor do GI no equilíbrio.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo calculado o desvio padrão amostral com $n=3$. Análises estatísticas (teste F e teste T) foram realizadas a partir dos softwares Microsoft® Excel para Mac v. 16.56, com $n = 3$. Para análise de resultados, foi utilizado o valor de GI dos hidrogéis quando atingiram o equilíbrio (massa constante) em ensaios com água destilada ou solução tampão de pH 1,2 e 6,8.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

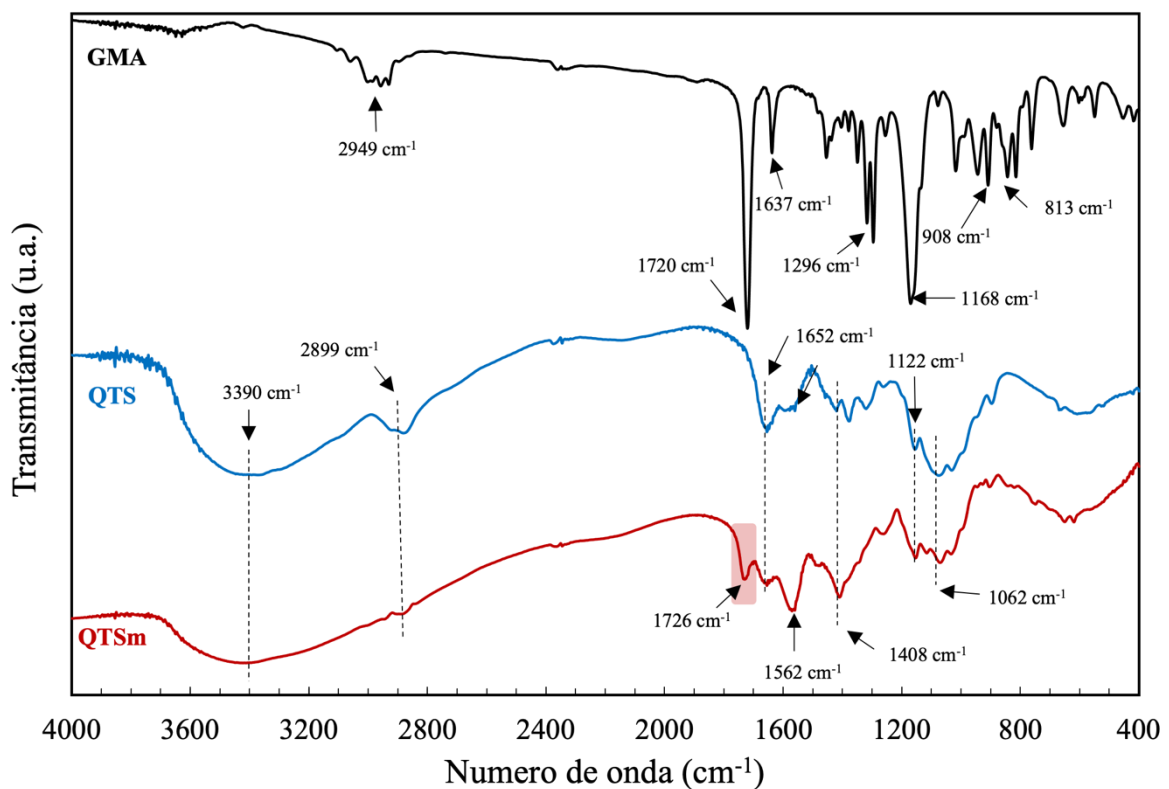
5.2.1 Modificação química da quitosana

A fim de promover a formação de radicais a partir do polissacarídeo QTS, realizou-se a modificação química do polissacarídeo utilizando o GMA, visando inserir grupamentos vinílicos à estrutura nativa (prévia a reação de polimerização) deste biopolímero e permitir a síntese de um hidrogel químico.

A modificação da QTS em meio ácido ocorreu por abertura do anel epóxido do GMA, podendo ser obtidos dois produtos, o 3-metacrilóil-1-gliceril éter de QTS (a) e 3-metacrilóil-2-gliceril éter de QTS (b), segundo o mecanismo ilustrado no item 2.4.3 (apresentados na introdução).

Para confirmar a modificação química da QTS, a análise de transmitância de FTIR dos compostos GMA, QTS e QTSm foi realizada (Figura 19).

Figura 19. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier para as amostras GMA, QTS e QTSm; em (B) observamos a ampliação do espectro na região 2000-1200 cm^{-1} .



Fonte: a autora.

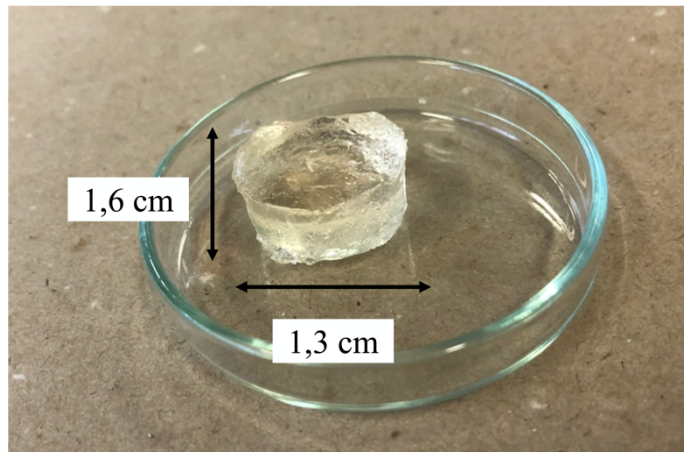
Para o espectro do GMA, podemos observar bandas em 1168 e 1296 cm^{-1} , referentes às ligações éster de sua estrutura e em 2949 cm^{-1} correspondente à CH de CH_2 . O anel epóxido possui bandas características em 813 e 908 cm^{-1} . O grupamento vinílico ($\text{C}=\text{C}$) apresenta uma banda em $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ e o grupamento carboxila ($\text{C}=\text{O}$) em $\sim 1720 \text{ cm}^{-1}$, sendo estas as bandas de interesse para a confirmação da reação de modificação do polissacarídeo.

É possível observar que, nos espectros das amostras de QTS e QTSm há a presença de bandas características de grupos funcionais presentes na estrutura do polissacarídeo não modificado. Em $\sim 3390 \text{ cm}^{-1}$, pode-se observar uma banda referente aos grupos $-\text{OH}$ dos monômeros de glucosamina, presentes em C3 e C6. No espectro da QTSm a banda de $-\text{OH}$ se encontra um pouco menos pronunciada, indicando que a reação de modificação pode ter ocorrido nestas hidroxilas. Nas amostras também pode-se observar uma banda em $\sim 1562 \text{ cm}^{-1}$ referente a grupamentos $-\text{NH}_2$ característicos da presença do grupo amina em C2. As bandas em ~ 1062 e 1122 cm^{-1} , referentes à ligação C-O de acetal e C-O-C referente às ligações glicosídicas do polissacarídeo. (PELLÁ, *et al.* 2020; SHAO *et al.*, 2011).

Para a confirmação da reação de modificação, podemos notar o surgimento de bandas no espectro da QTSm, referentes à adição da estrutura do GMA no polissacarídeo. Assim verificamos o aparecimento de uma banda pronunciada em 1726 cm^{-1} referente ao grupo $\text{C}=\text{O}$ presente na estrutura do GMA. Outro indicativo da modificação é a alteração na banda de 1652 cm^{-1} , que está associada à inserção de grupos vinílicos do GMA na estrutura da QTS. Em 1408 , há o aparecimento da banda referente a grupamentos $-\text{COO}^-$. A ausência de bandas em 813 e 908 cm^{-1} no espectro de QTSm indica que a reação de modificação ocorreu por abertura do anel epóxido do GMA. (PELLÁ, *et al.* 2020; SHAO *et al.*, 2011).

Para a confirmação das análises obtidas, um teste qualitativo foi realizado. Para tanto, 200 mg de QTSm e 0,5 mL de DMA foram acrescentados sob agitação em 4,5 mL de solução ácido acético $0,4 \text{ mol L}^{-1}$. Quando a temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ foi atingida, 17 mg de persulfato de potássio foram acrescentados para iniciar a reação de polimerização. A formação do hidrogel apresentado na Figura 20 comprova que a modificação da QTS com grupamentos vinílicos ocorreu de forma eficiente.

Figura 20. Aspecto macroscópico do hidrogel baseado em 200 mg de QTSm e 0,5 mL de DMA.



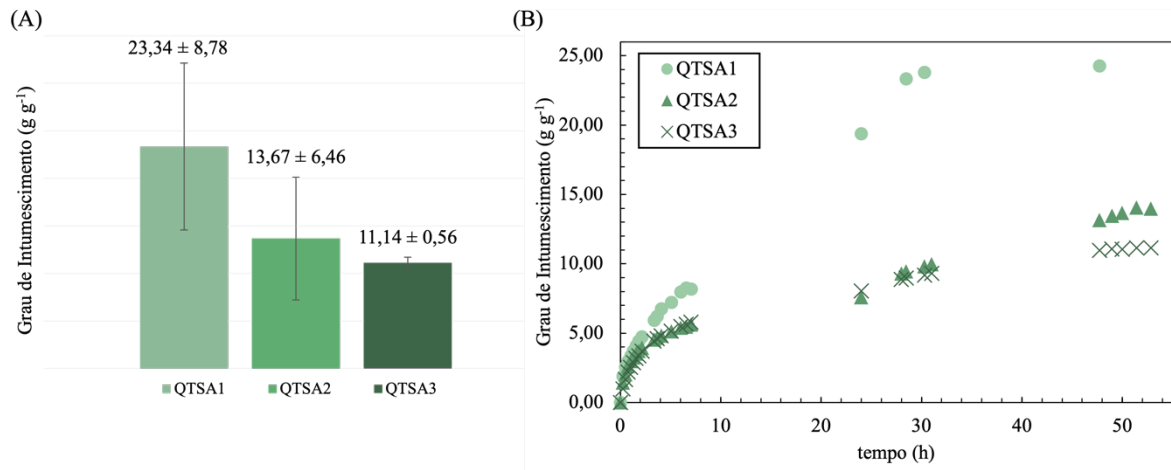
Fonte: a autora.

5.2.2 Síntese de hidrogéis baseados em QTSm

Os hidrogéis baseados em QTSm foram sintetizados de acordo com a Tabela 4, utilizando-se dois níveis de QTSm, sendo os hidrogéis QTSA compostos por 500 mg e QTSB por 550 mg de QTSm. O volume do espaçador DMA também foi variado. Devido à solubilidade da QTS, os hidrogéis foram sintetizados em solução de ácido acético $0,4 \text{ mol L}^{-1}$. Por se tratar do uso de QTS de baixa massa molecular, a quantidade de polissacarídeo utilizado para a síntese do hidrogel foi maior quando comparados aos hidrogéis baseados em GX (50 e 55 mg). Com a mesma formulação, não foi possível a reticulação do polissacarídeo e, conseqüentemente, formação de hidrogel. A formulação que capacitou a reticulação com a quantidade de DMA testada foi de 500 mg de QTS.

Os primeiros hidrogéis sintetizados foram os de formulação QTSA1 (0,30 mL DMA), QTSA2 (0,50 mL DMA), QTSA3 (0,70 mL DMA), QTSB1 (0,35 mL DMA), QTSB2 (0,55 mL DMA) e QTSB3 (0,75 mL DMA). Inicialmente realizou-se os ensaios de intumescimento em água destilada dos hidrogéis de formulação QTSA, o quais atingiram o equilíbrio em aproximadamente 30 h de ensaio. Os valores de GI no equilíbrio e o perfil de intumescimento para os hidrogéis de formulação QTSA estão representados na Figura 21.

Figura 21. Ensaios de intumescimento de hidrogéis de formulação QTSA1, QTSA2 e QTSA3 em água destilada: (A) valores de GI no equilíbrio e (B) perfil de intumescimento.



Fonte: a autora.

Os hidrogéis baseados em 500 mg QTSA, QTSA1, QTSA2 e QTSA3, apresentaram uma diminuição gradual nos valores medidos de GI em resposta ao acréscimo do agente espaçador DMA. Uma vez que os hidrogéis aqui já apresentam uma elevada quantidade de polissacarídeo na formulação, o uso de maiores quantidades do DMA provavelmente resultou em um aumento da densidade de cadeia polimérica, dificultando assim a entrada de água nos poros da matriz, comprometendo assim o grau de intumescimento dos hidrogéis. Contudo, os hidrogéis com menores quantidades de DMA, apresentaram uma maior fragilidade estrutural, fragmentando-se ao longo dos experimentos e por consequentemente, aumentando o desvio obtido nos ensaios, conforme mostram os elevados valores de desvio padrão. Todos os hidrogéis de formulação QTSA sintetizados nesta primeira etapa não apresentaram diferença significativa nos resultados de GI (conforme valores de teste T apresentados no ANEXO II). Apesar de não haver diferença entre os resultados de GI, observou-se que o aumento da quantidade de DMA resultou na diminuição da fragilidade dos materiais sintetizados.

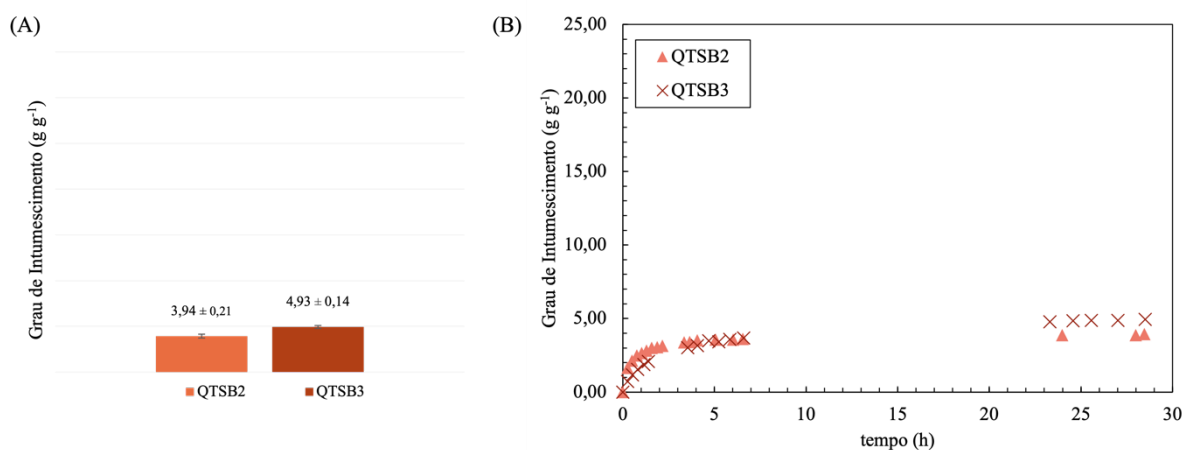
Para a análise da significância do parâmetro DMA, foi realizado um teste estatístico ANOVA de fator único no software Microsoft Excel[®] (Tabela 5), em que o teste F indica que não há diferença estatística para a quantidade de DMA no intervalo analisado, o que foi corroborado pelos testes T, em que não há diferença significativa entre os hidrogéis de formulação QTSA.

Tabela 5. Análise estatística ANOVA de fator único para hidrogéis de formulação QTSA1, QTSA2 e QTSA3.

| ANOVA | | | | | | |
|-------------------|------------|-----------|------------|------------|----------------|------------------|
| Fonte de variação | <i>SQ</i> | <i>gl</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | valor <i>P</i> | <i>F crítico</i> |
| Entre grupos | 286,700125 | 2 | 143,350063 | 2,03694025 | 0,21128242 | 5,14325285 |
| Dentro de grupos | 422,251156 | 6 | 70,3751926 | | | |
| Total | 708,951281 | 8 | | | | |

Fonte: a autora.

Para os hidrogéis de formulação QTSB, o hidrogel QTSB1 não resultou em um hidrogel estável, contudo, as demais formulações foram efetivas e seguiram para ensaios de intumescidos em água, em triplicata visando a obtenção dos valores de GI. Os hidrogéis de formulação QTSB atingiram o equilíbrio de intumescimento em aproximadamente 4 h, sendo explicado pela densidade de cadeia dos hidrogéis sintetizados. Os hidrogéis de formulação QTSB possuem maior massa de polissacarídeo acrescentada, resultando em maior quantidade de ligações cruzadas na rede tridimensional polimérica, dificultando a entrada de água nos poros do hidrogel quando relacionados aos hidrogéis de formulação QTSA. Os valores de GI no equilíbrio e o perfil de intumescimento dos hidrogéis QTSB estão representados na Figura 22.

Figura 22. Ensaios de intumescimento de hidrogéis de formulação QTSB2 e QTSB3 em água destilada: (A) valores de GI no equilíbrio e (B) perfil de intumescimento.

Fonte: a autora.

As formulações QTSB2 e QTSB3, por sua vez, apresentam uma maior massa de QTSm, aumentando a densidade de cadeia. A QTS possui grupamentos amina que podem ser protonados em valores de pH inferiores ao seu pKa (6,5) e desprotonados em valores de pH

superiores. Quando desprotonados, podem estabelecer ligações de ponte de hidrogênio, dificultando o afastamento das cadeias poliméricas e a entrada de água. Em pH da água destilada (pH 5,5), os grupamentos amina estão protonados, ($-\text{NH}_3^+$), fornecendo ao hidrogel uma carga líquida positiva e aumentando a repulsão eletrostática entre as cadeias poliméricas, afastando-as e permitindo maior entrada de água.

Apesar de os hidrogéis de formulação QTSB possuírem mais unidades monoméricas passíveis de ionização, a maior massa de QTSm utilizada aumenta a quantidade de ligações cruzadas na matriz polimérica, dificultando a entrada de água, o que justifica os valores de GI inferiores aos observados para as formulações QTSA. Contudo, a formulação QTSB3, com maior quantidade de DMA acrescentada, apresentou um discreto aumento em seu valor de GI, o que pode ser justificado pelo maior afastamento das cadeias do polissacarídeo, facilitando a entrada de água destilada na matriz do hidrogel. É possível também considerar que, na estrutura da QTS ainda podem ser encontradas algumas unidades de β -1,4-acetil-D-glucosamina, que podem contribuir minimamente para a aproximação das cadeias poliméricas, já que o oxigênio presente no grupamento acetil é capaz de realizar ligações de hidrogênio com o grupamento amina.

Para a análise da significância da alteração do parâmetro DMA, foi realizado um teste estatístico ANOVA de fator único (Tabela 6), em que o teste F indicou que a quantidade de espaçador acrescentada no hidrogel influencia significativamente na formulação do hidrogel e seu GI. Para a análise da diferença significativa entre as formulações QTSB2 e QTSB3, também foi realizado um teste T (anexo II), em que indica que as amostras são estatisticamente diferentes.

Tabela 6. Análise estatística ANOVA de fator único para hidrogéis de formulação QTSB1, QTSB2 e QTSB3.

| ANOVA | | | | | | |
|--------------------------|------------|-----------|------------|------------|----------------|------------------|
| <i>Fonte de variação</i> | <i>SQ</i> | <i>gl</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>valor P</i> | <i>F crítico</i> |
| Entre grupos | 1,47714398 | 1 | 1,47714398 | 46,9768993 | 0,0023721 | 7,70864742 |
| Dentro de grupos | 0,1257762 | 4 | 0,03144405 | | | |
| Total | 1,60292018 | 5 | | | | |

Fonte: a autora.

Com o perfil de intumescimento em água destilada dos hidrogéis baseados em QTSm e um ajuste para valores que se aproximam da linearidade, é possível calcular o expoente de

difusão dos hidrogéis de acordo com a Lei da Potência. Os resultados de valor de expoente de difusão e mecanismo de intumescimento estão representados na Tabela 7.

Tabela 7. Mecanismo de Intumescimento de Hidrogéis baseados em QTSm.

| Hidrogel | GI (g g^{-1}) | Expoente de Difusão (n) | Mecanismo |
|----------|--------------------------|-------------------------|------------------|
| QTSA1 | $23,34 \pm 8,78$ | 0,37 | Difusão Fickiana |
| QTSA2 | $13,67 \pm 6,46$ | 0,27 | Difusão Fickiana |
| QTSA3 | $11,14 \pm 0,56$ | 0,36 | Difusão Fickiana |
| QTSB2 | $3,94 \pm 0,21$ | 0,25 | Difusão Fickiana |
| QTSB3 | $4,93 \pm 0,14$ | 0,34 | Difusão Fickiana |

Fonte: a autora.

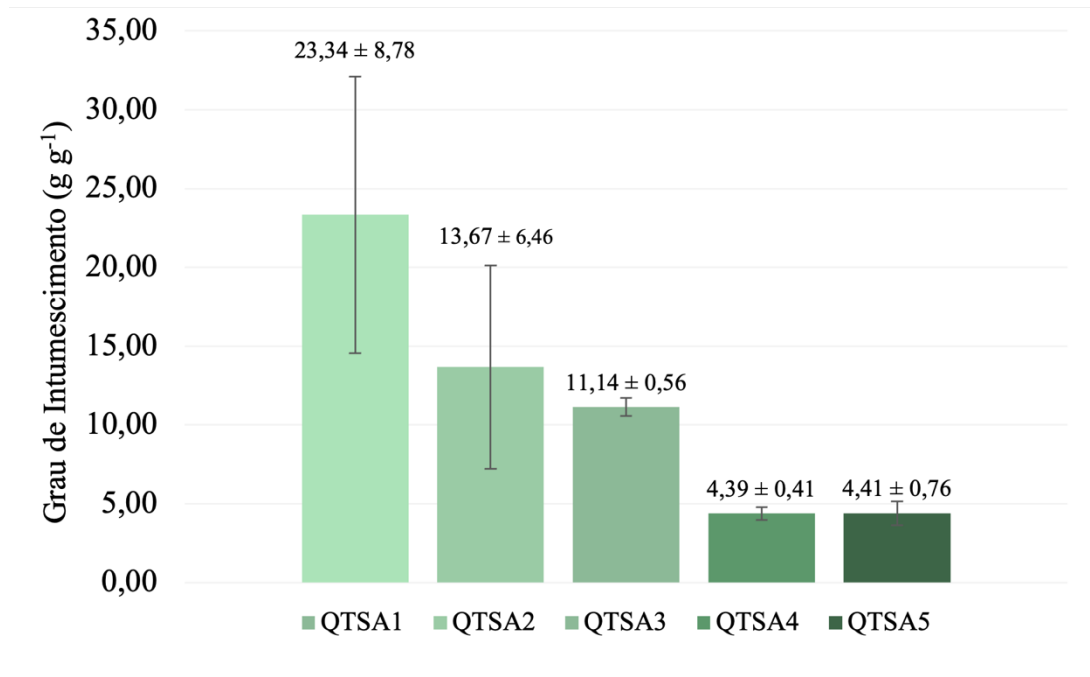
Para todos os hidrogéis sintetizados, o mecanismo de intumescimento se dá via difusão Fickiana, já que há uma grande quantidade de grupos capazes de realizar ligações de hidrogênio, dificultando o afastamento das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, a entrada de água na matriz polimérica.

Os hidrogéis de formulação QTSA2 e QTSB2 possuem a mesma proporção de polissacarídeo e espaçador DMA, em uma relação 1:0,5, sendo possível confirmar que o valor de GI no equilíbrio possui uma variação significativa com o aumento da quantidade de QTSm e DMA acrescentada. Este resultado confirma que a dificuldade da entrada de água na matriz do hidrogel se dá pelo aumento de grupamentos amina e da densidade de cadeia, já que a massa que forma o hidrogel de formulação QTSB2 é maior que a massa que forma o hidrogel QTSA2.

Após a análise preliminar dos hidrogéis, novas formulações foram sintetizadas de forma a diminuir a fragilidade dos materiais, e a fim de obter diferenças mais significativas nos valores de GI obtidos no equilíbrio. Assim foram desenvolvidas as formulações QTSA4 (1,50 mL DMA), QTSA5 (2,0 mL DMA) e QTSA6 (2,5 mL DMA) definidos na Tabela 4 (apresentada em materiais e métodos). A formulação QTSA6 não formou hidrogel químico, devido ao volume de solução de ácido acético utilizada para o volume final de 5,00 mL ser insuficiente para solubilizar a totalidade de QTSm acrescentada.

Foram então realizados os ensaios de intumescimento dos hidrogéis QTSA4 e QTSA5 em água destilada, e os valores de GI observados no equilíbrio estão representados na Figura 23 abaixo.

Figura 23. Valores de GI médio no equilíbrio de intumescimento em água destilada de hidrogéis baseados em QTSm.



Fonte: a autora.

Com o acréscimo da quantidade de espaçador nas formulações, a matriz polimérica formada se tornou menos frágil, diminuindo o desvio obtido nos ensaios. O acréscimo de uma maior quantidade de DMA, contudo, aumentou a densidade de cadeia na matriz polimérica do hidrogel, diminuindo significativamente o valor de GI no equilíbrio. O mecanismo de reação foi definido pelo ajuste da Lei da Potência e apresentado na Tabela 8 e todos os materiais sintetizados apresentaram mecanismo de difusão Fickiana. Os hidrogéis QTSA4 e QTSA5 não apresentaram uma alteração significativa no valor de GI, obtendo o mesmo valor de expoente de difusão, indicando que a contribuição da entrada de água destilada por difusão foi a mesma. Este resultado sugere que o aumento do volume de DMA utilizado na formulação dos hidrogéis não altera significativamente os valores de GI médio ou o mecanismo de intumescimento para volumes superiores a 1,50 mL de DMA (QTSA4).

Tabela 8. Mecanismo de intumescimento para hidrogéis de formulação QTSA.

| Hidrogel | GI (g g ⁻¹) | Expoente de Difusão (n) | Mecanismo |
|----------|-------------------------|-------------------------|------------------|
| QTSA1 | 23,34 ± 8,78 | 0,37 | Difusão Fickiana |
| QTSA2 | 13,67 ± 6,46 | 0,27 | Difusão Fickiana |
| QTSA3 | 11,14 ± 0,56 | 0,36 | Difusão Fickiana |
| QTSA4 | 4,39 ± 0,41 | 0,28 | Difusão Fickiana |
| QTSA5 | 4,41 ± 0,76 | 0,28 | Difusão Fickiana |

Fonte: a autora.

Com os novos resultados de GI no equilíbrio para as novas formulações, realizou-se um segundo teste ANOVA de fator único (Tabela 9) para analisar a significância do fator DMA nos hidrogéis contendo 500 mg de QTSM. O teste F indica que, neste caso, a quantidade de espaçador acrescentada na síntese do material é significativa, alterando o valor de resposta de GI.

Tabela 9. Análise estatística ANOVA de fator único para hidrogéis de formulação QTSA.

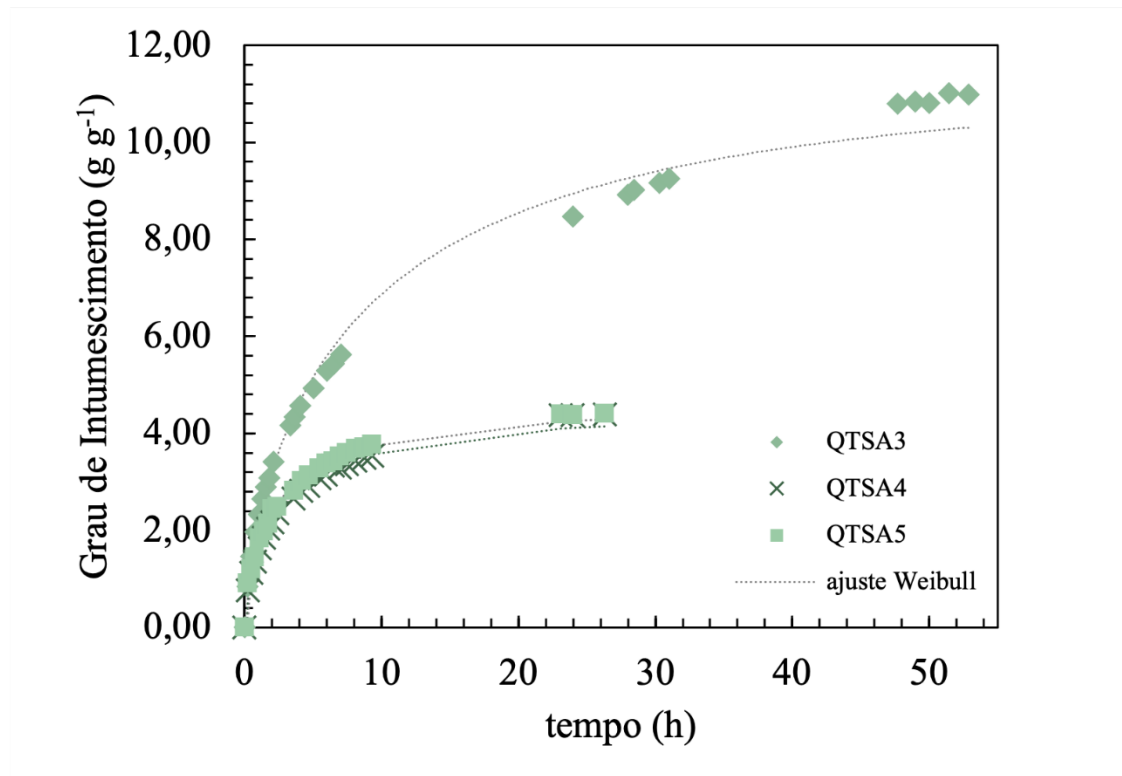
| ANOVA | | | | | | |
|-------------------|------------|-----------|------------|------------|----------------|------------------|
| Fonte de variação | <i>SQ</i> | <i>gl</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | valor <i>P</i> | <i>F crítico</i> |
| Entre grupos | 810,434588 | 4 | 202,608647 | 4,78136726 | 0,02043679 | 3,47804969 |
| Dentro de grupos | 423,746255 | 10 | 42,3746255 | | | |
| Total | 1234,18084 | 14 | | | | |

Fonte: a autora.

A fim de comparar a diferença significativa entre os hidrogéis, realizou-se um teste T de Student para as amostras analisadas e observou-se que os hidrogéis de formulação QTSA3 e QTSA4, QTSA3 e QTSA5 são diferentes entre si, porém os de formulação QTSA4 e QTSA5 não apresentam diferenças significativas. Estes resultados corroboram a hipótese de que o aumento da quantidade de DMA para a formulação QTSA5 não resultou em alterações nos resultados dos ensaios de intumescimento.

Para os hidrogéis que apresentaram menor fragilidade e menor desvio padrão experimental, estudou-se a cinética de intumescimento por meio do ajuste Weibull para os ensaios realizados em água destilada, e os resultados dos perfis de intumescimento estão apresentados na Figura 24.

Figura 24. Perfil de intumescimento para os hidrogéis de formulação QTSA3, QTSA4 e QTSA5 com ajuste Weibull.



Fonte: a autora.

A partir do ajuste da função Weibull para os valores obtidos de GI durante o ensaio, foi possível encontrar as constantes de velocidade (k) e constante d , relacionada com a matriz polimérica do hidrogel. Os valores de k e d estão apresentados na Tabela 10 abaixo.

Tabela 10. Valores encontrados para as constantes k e d obtidas a partir do ajuste da função Weibull para os hidrogéis de formulação QTSA3, QTSA4 e QTSA5.

| | k (h ^{-d}) | d | R ² |
|-------|------------------------|--------|----------------|
| QTSA3 | 0,2849 | 0,5631 | 0,9869 |
| QTSA4 | 0,6448 | 0,4741 | 0,9696 |
| QTSA5 | 0,6883 | 0,4707 | 0,9756 |

Fonte: a autora.

Os resultados obtidos de k e d para os hidrogéis de formulação QTSA4 e QTSA5 se mostraram próximos, indicando que a mudança na formulação não alterou o perfil de transporte da água destilada para a matriz do hidrogel. O hidrogel de formulação QTSA3, no entanto, apresentou um menor valor de k quando comparados à outras amostras, indicando que a

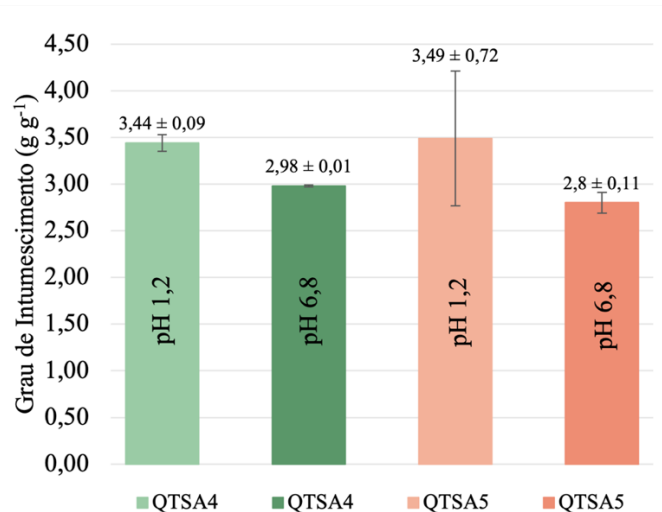
velocidade de intumescimento é menor quando comparada com os demais hidrogéis, ou seja, necessita de mais tempo de ensaio para atingir o equilíbrio.

Estes valores estão diretamente relacionados com a formulação dos hidrogéis, já que, em QTSA3 há uma menor densidade de reticulação, o que facilita a entrada de água na matriz do material, resultando em maiores valores de GI e um maior tempo necessário para atingir o equilíbrio.

5.2.3 *pH-responsividade de hidrogéis baseados em QTSm*

Visando analisar o caráter pH-responsivo dos hidrogéis baseados em QTS e uma possível utilização destes materiais como veículos para sistemas de liberação controlada de fármacos, ensaios de intumescimento foram realizados em soluções tampão pH 1,2 e 6,8, a temperatura controlada de 37 °C. Conforme já mencionado anteriormente, os ensaios em pH 1,2 tem por objetivo simular o ambiente gástrico, enquanto o pH 6,8, o ambiente intestinal. Os ensaios foram realizados somente com os hidrogéis de formulação QTSA4 e QTSA5 por terem sido estes os que apresentaram menor fragilidade nos ensaios de intumescimento em água. Estes ensaios foram realizados ao longo de um intervalo de 4 h, a fim de estudar o mecanismo de liberação nos momentos iniciais do intumescimento, podendo assim serem ajustados por função Weibull e Peppas-Sahlin (1989). Os valores obtidos de GI no equilíbrio para cada hidrogel, são apresentados na Figura 25.

Figura 25. Grau de Intumescimento de hidrogéis baseados em QTS após 4h em solução tampão pH 1,2 e 6,8 a 37 °C.

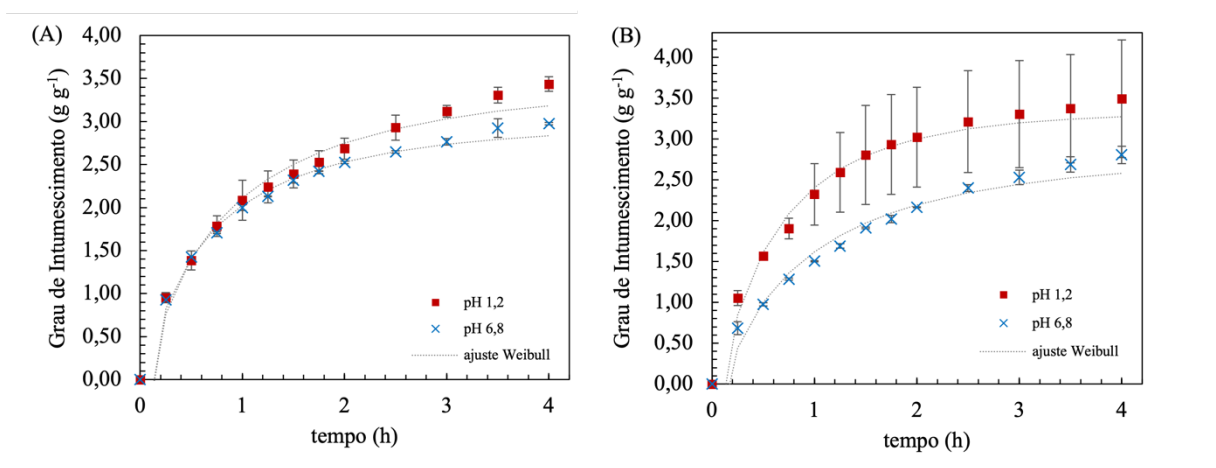


Como já dito, os grupamentos $-NH_2$ da QTS podem estar carregados positivamente em condições de pH inferiores ao seu pK_a (6,3). Assim, em pH 1,2 os polissacarídeos na matriz dos hidrogéis estarão carregados positivamente, resultando em repulsão eletrostática entre as cargas positivas das cadeias poliméricas e o seu afastamento, o que facilita a entrada de fluídos na matriz do material. Em pH 6,8 contudo, os grupamentos amina tendem a desprotonação em sua maioria, o que deixaria o polissacarídeo na matriz do hidrogel com caráter neutro, ou levemente positivo. O processo de desprotonação do grupo amina permite o estabelecimento de ligações de hidrogênio que resultam na diminuição das vacâncias no material, dificultando assim o intumescimento. A pequena diferença entre o pH do sistema e o pK_a do grupamento amina, neste caso, pode ter impedido que todas as unidades se encontrassem desprotonadas, consequentemente, diminuindo a pH-responsividade do material.

Conforme a Figura 25 nos mostra, o hidrogel QTSA4 apresentou características pH-responsivas, porém o hidrogel QTSA5 não, provavelmente devido ao maior grau de reticulação das cadeias poliméricas, o que dificultaria a repulsão eletrostática entre as cadeias poliméricas em solução pH 1,2, diminuindo assim a resposta à mudança de pH.

O perfil de intumescimento com ajuste da função Weibull para ambos os hidrogéis pode ser observado na Figura 26, a seguir, contudo, para o estudo dos valores da constante de velocidade k , utilizou-se apenas o hidrogel QTSA4, já que somente ele apresentou pH-responsividade. Os valores das constantes k e d obtidas a partir do ajuste da função Weibull estão apresentados na Tabela 11.

Figura 26. Perfil de intumescimento de hidrogéis de formulação QTSA4 em solução tampão de H 1,2 e 6,8, à temperatura de 37 °C.



Fonte: a autora.

Tabela 11. Valores das constantes k e d para o intumescimento dos hidrogéis QTSA4 em soluções tampão de pH 1,2 e 6,8.

| | pH | k | d | R^2 |
|-------|-----|-------|-------|-------|
| QTSA4 | 1,2 | 1,215 | 0,627 | 0,955 |
| | 6,8 | 1,432 | 0,609 | 0,960 |

Fonte: a autora.

Os valores de constante de velocidade, bem como o perfil de intumescimento do hidrogel QTSA4 mostram que este atinge o equilíbrio de intumescimento mais rapidamente em solução tampão pH 6,8, já que, nestas condições, observa-se um menor valor de GI. Em pH 1,2, o menor valor da constante de velocidade k está de acordo com o fato do hidrogel atingir o equilíbrio em um intervalo de tempo maior.

Através da Lei da Potência, ajustou-se os valores obtidos de GI ao longo do intumescimento em ambas as condições de pH, e os valores de expoente de difusão foram estimados e correlacionados com mecanismo de intumescimento para as duas formulações, considerando-se o formato cilíndrico (Tabela 12).

Tabela 12. Mecanismo de intumescimento para hidrogéis QTSA4 e QTSA5 em soluções tampão a 37 °C.

| | pH | n | k | Mecanismo de Transporte |
|-------|-----|-------|-------|-------------------------|
| QTSA4 | 1,2 | 0,320 | 0,378 | Difusão Fickiana |
| | 6,8 | 0,492 | 0,327 | Transporte anômalo |
| QTSA5 | 1,2 | 0,346 | 0,308 | Difusão Fickiana |
| | 6,8 | 0,295 | 0,423 | Difusão Fickiana |

Fonte: a autora.

Para os hidrogéis baseados em QTS, a diferença no expoente de difusão só resulta em diferentes mecanismos de transporte para o hidrogel de formulação QTSA4, já que o hidrogel de formulação QTS5 não apresenta características de pH-responsividade. O mecanismo de transporte anômalo observado no ensaio de intumescimento em solução de pH 6,8 pode ser quantificado quanto às contribuições individuais de difusão e relaxação macromolecular. Para tal, realizou-se um ajuste de Peppas-Sahlin (1989) para a porção de crescimento linear dos valores de GI, em que se obteve um resultado de k_d de ordem zero e, para k_r , o valor da constante de $0,208 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,971$), indicando que houve maior contribuição da relaxação macromolecular para o mecanismo de intumescimento.

Os hidrogéis baseados em QTS podem apresentar pH-responsividade de forma a intumescer e obter maiores valores de GI em solução de pH 1,2, devido aos grupamentos amina ($-\text{NH}_2$)

presentes na estrutura química da QTS. Estas características pH-responsivas permitem que hidrogéis de QTS sejam utilizados como veículos na liberação de fármacos no estômago, permitindo que haja uma maior liberação em neste meio. Dependendo da formulação, pode liberar fármacos rapidamente neste meio, ou de forma controlada. Para esta aplicação, no entanto, o hidrogel de formulação QTSA5 se mostrou mais promissor, porém ajustes na formulação podem ser consideradas, de forma a adequar o caráter pH-responsivo dos materiais sintetizados.

5.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A modificação química do polissacarídeo foi necessária para a síntese de hidrogéis quimicamente reticulados. Os hidrogéis baseados em QTS apresentaram valores de GI baixos devido ao grau de reticulação da cadeia polimérica, uma vez que todos apresentaram mecanismo de transporte de difusão Fickiana, o que implica uma dificuldade do afastamento das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, da entrada de água na matriz. Por possuir grupamentos amina passíveis de ionização, os hidrogéis podem apresentar caráter pH-responsivo, sendo o hidrogel de formulação QTSA5 o que apresentou maior diferença entre os valores de GI em solução de pH 1,2 e 6,8, sendo o hidrogel que apresenta resultados promissores na síntese de dispositivos de liberação controlada de fármacos no estômago.

5.4 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir das formulações de hidrogéis baseados em QTS, novas formulações podem ser estudadas a fim de promover melhores resultados de pH-responsividade em soluções de fluido gastrointestinal simulado, para a aplicação em um fármaco modelo que possua absorção ou ação no estômago, como a hidrocortisona, por exemplo.

6 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS BASEADOS EM GOMA XANTANA PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE VITAMINA B12

6.1 MATERIAL E MÉTODOS

6.1.1 *Material*

- Reagentes: Goma Xantana (Danisco-SP), metacrilato de glicidila 97% (Sigma-Aldrich), *N,N*-dimetil-acrilamida 99% (Sigma-Aldrich), ácido acético glacial 99,7% (Perquim), etanol 95% (Perquim), persulfato de potássio (Dinâmica), hidróxido de sódio (Dinâmica), fosfato de potássio monobásico (Dinâmica), ácido clorídrico 37%, cloreto de sódio (Neon), Vitamina B₁₂ 98% (Sigma-Aldrich).
- Equipamentos: agitador magnético, Liofilizador L202/Liotop, Espectrofotômetro UV-Vis (Kasuki, model 11592). Incubadora Shaker (SP-222/SPLABOR - Laboratório de pesquisa LEQQA – UEPG). Espectrômetro Infravermelho FTIR (IRPrestige-21 com acessório de refletância difusa, DRS-8000/Shimadzu), Microscópio Eletrônico de Varredura – Field Emission Gun (Mira 3/Tescan), Sistema Liquefator de Nitrogênio (StirLiN-1 Economy/Stirlin) – Equipamentos pertencentes ao C-Labmu (UEPG)

6.1.2 *Modificação química da goma xantana*

A reação de modificação química da GX foi realizada seguindo a metodologia adaptada de REIS et al. (2009). Para tanto, adicionou-se 5,0 g de GX e 5,0 mL de metacrilato de glicidila (GMA) em 500 mL de água destilada. A solução foi então aquecida a 60 °C, o pH do sistema reacional ajustado com ácido acético glacial para pH próximo a 3,5 e mantida sob agitação magnética e aquecimento durante 24 h. Após a síntese, o produto foi precipitado utilizando etanol 95% e posteriormente, seco a temperatura ambiente para a obtenção da GX modificada (GXm). Os polissacarídeos nativo e modificado foram na sequência caracterizados por análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), com as amostras na forma de pastilhas de KBr, no modo transmitância, com resolução de 4 cm⁻¹, sendo o intervalo da análise entre 400 à 4000 cm⁻¹ e com acúmulo de 64 scans.

6.1.3 Preparo e caracterização dos hidrogéis

Os hidrogéis foram sintetizados por meio de reação de reticulação via radicalar. Para tanto, diferentes formulações foram produzidas utilizando a GXm como macromonômero e a *N,N'*-dimetil-acrilamida (DMA) como agente espaçador, conforme apresentado Tabela 13. Para a síntese, após a homogeneização dos reagentes GX e DMA, aqueceu-se o sistema até a temperatura de 60 °C, sob agitação magnética. Após o aquecimento, adicionou-se 17,0 mg do iniciador persulfato de potássio ao meio reacional. Os hidrogéis foram sintetizados num volume total de 5,0 mL, utilizando-se água destilada como solvente e formando um material cilíndrico, uma vez que foram polimerizados em béqueres. Após a síntese, os hidrogéis foram secos em estufa à temperatura média de 50 °C.

Tabela 13. Formulações de hidrogéis a base de GXm e DMA sintetizados.

| Formulação | GXm (mg) | DMA (mL) |
|------------|----------|----------|
| GXA1 | 50,0 | 0,030 |
| GXA2 | 50,0 | 0,050 |
| GXA3 | 50,0 | 0,070 |
| GXA4 | 50,0 | 0,150 |
| GXA5 | 50,0 | 0,200 |
| GXA6 | 50,0 | 0,250 |
| GXB1 | 80,0 | 0,060 |
| GXB2 | 80,0 | 0,080 |
| GXB3 | 80,0 | 0,100 |

Fonte: a autora.

6.1.4 Preparo de fluido gastrointestinal simulado

O fluido gastrointestinal simulado foi preparado a partir de soluções padrões que simulam pH e força iônica, porém na ausência de enzimas presentes no sistema. Para o preparo das soluções, utilizou-se a metodologia relatada na *United States Pharmacopeia* (USP) e *European Pharmacopeia* (EP). Desta forma a solução gástrica simulada foi preparada a partir de uma solução tampão pH 1,2 utilizando as concentrações de 2,00 g L⁻¹ de NaCl e 2,917 g L⁻¹

de HCl, enquanto o fluido intestinal simulado foi preparado a partir de uma solução tampão pH 6,8 utilizando 0,616 g L⁻¹ de NaOH e 6,800 g L⁻¹ de KH₂PO₄.

6.1.5 *Ensaio de intumescimento*

Os ensaios de intumescimento em água destilada foram realizados por gravimetria a temperatura ambiente, onde o hidrogel seco teve sua massa aferida anteriormente ao ensaio. Após submerso em água destilada, a massa adquirida foi determinada em intervalos de tempo pré-definidos (15 a 20 minutos), tomando-se o cuidado de remover o excesso de água superficial, até não mais se observar alterações de massa, momento em que se considerou como estado de equilíbrio. Com bases nos valores de massa calculou-se então o GI de acordo com a equação I, citada no item 2.2.

A partir das informações de massa, foi possível também calcular o mecanismo de intumescimento através da equação II (item 2.2) para cada formulação de hidrogel. Para este estudo de mecanismo, utilizou-se a Lei da Potência, de forma que o cálculo foi realizado considerando-se apenas a porção linear do perfil de intumescimento dos hidrogéis, ou seja, para o ajuste matemático foram utilizados apenas os valores até 60% do valor de GI no equilíbrio.

Os ensaios de intumescimento em fluido gastrointestinal simulado foram realizados com temperatura controlada de 37 °C em solução tampão de pH 1,2 e pH 6,8. Também foram realizados, afim de simular o perfil de intumescimento destes hidrogéis em condições observadas no sistema gastrointestinal real, realizou-se ensaios de intumescimento em solução tampão pH 1,2 (fluido gástrico simulado) por duas horas seguido por intumescimento em solução tampão pH 6,8 (fluido intestinal simulado) pelas próximas oito horas, sob temperatura de 37 °C, conforme a metodologia adaptada descrita por Reis et al., 2022.

Os resultados foram analisados de acordo com o GI e o mecanismo de intumescimento foi determinado utilizando 60% do valor do GI no equilíbrio.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo calculado o desvio padrão amostral com n=3. Análises estatísticas (teste F e teste T) foram realizadas a partir dos softwares Microsoft® Excel para Mac v. 16.56, com n = 3. Para análise de resultados, foi utilizado o valor de GI dos hidrogéis quando atingiram o equilíbrio (massa constante) em ensaios com água destilada ou solução tampão de pH 1,2 e 6,8.

6.1.6 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura

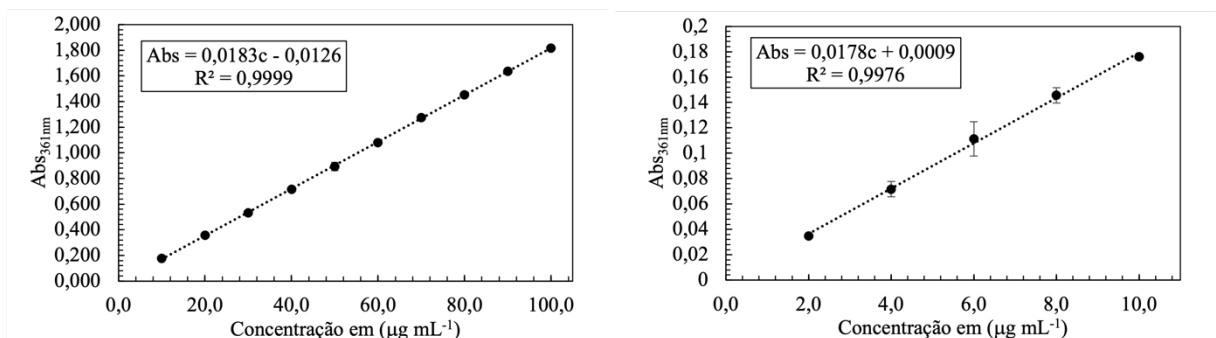
Para as análises de imagem, após o equilíbrio, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas e, então, foi realizada a análise de Microscopia eletrônica de varredura - Field Emission Gun. As amostras foram recobertas com ouro e a imagem foi obtida nas condições de tensão 15 kV e 106 mA de corrente.

6.1.7 Ensaios de liberação de Vitamina B₁₂

A vitamina B₁₂ (VB₁₂) foi carregada nos hidrogéis através do método de difusão (Tan et al., 2015). Para tanto, os hidrogéis secos, com massas aproximadas de 50 mg, foram adicionados em um recipiente contendo 10 mL de solução 100 µg mL⁻¹ de VB₁₂ em água destilada, durante 72 h à temperatura ambiente. Posteriormente, os hidrogéis foram retirados das soluções e a massa da vitamina restante nas soluções (m_1) foi determinada por Espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-Visível (UV-Vis) no comprimento de onda de 361 nm.

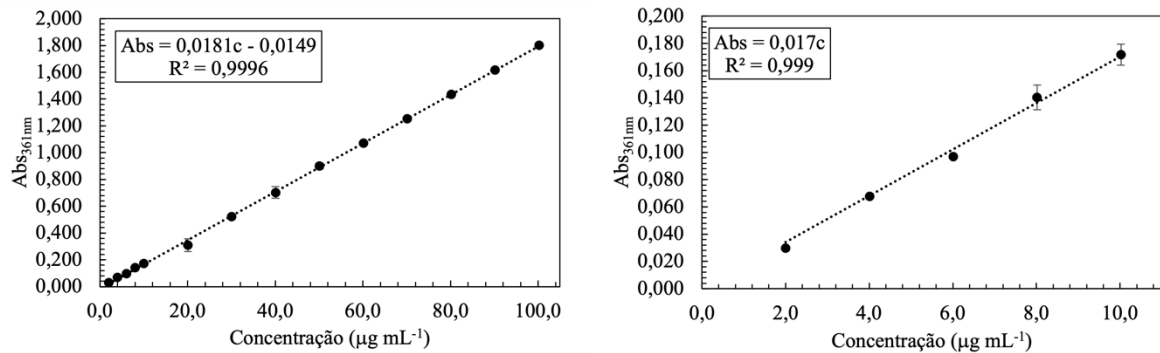
Para estes ensaios foram construídas curvas de calibração em duas diferentes faixas de concentração (2 a 10 e 10 a 100 µg mL⁻¹), conforme apresentado na Figura 27 - 29. Os hidrogéis foram então lavados com 10 mL de água destilada para a retirada de possíveis traços do fármaco que porventura tivessem ficado na superfície. Da mesma forma, a concentração da vitamina nesta água de lavagem foi determinada por UV-Vis, com auxílio das curvas analíticas de padrão externo. A massa de fármaco encontrada foi então denominada m_2 .

Figura 27. Curva-padrão de Vitamina B₁₂ em água destilada para as concentrações de 10,0 a 100,0 µg mL⁻¹ e 2,0 a 10,0 µg mL⁻¹.



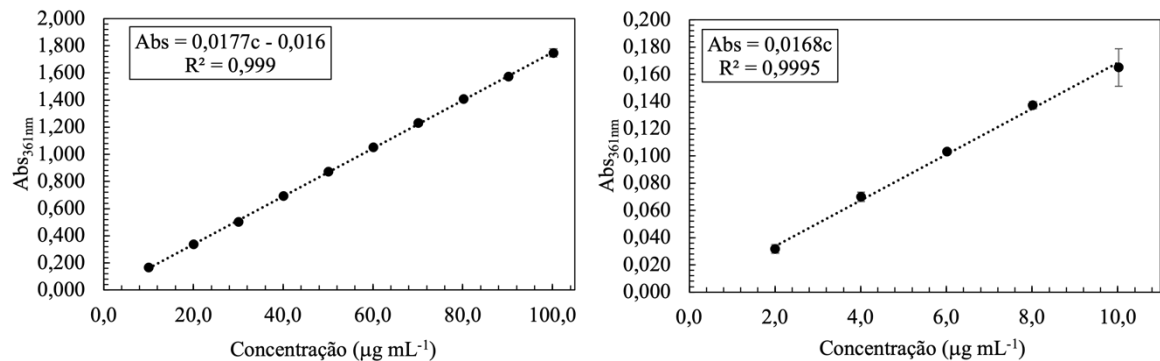
Fonte: a autora.

Figura 28. Curva de padrão externo de Vitamina B₁₂ em solução tampão de pH 1,2 para as concentrações de 10,0 a 100,0 µg mL⁻¹ e 2,0 a 10,0 µg mL⁻¹.



Fonte: a autora.

Figura 29. Curva de padrão externo de Vitamina B₁₂ em solução tampão de pH 6,8 para as concentrações de 10,0 a 100,0 µg mL⁻¹ e 2,0 a 10,0 µg mL⁻¹.



Fonte: a autora.

A massa de VB₁₂ encapsulada (µg de VB₁₂ por g de hidrogel seco) foi determinada com a equação:

$$VB_{12}(ug_{VB_{12}}/mg_{hidrogel}) = \frac{C_0V_0 - (m_1 + m_2)}{m} \quad (III)$$

onde C_0 é a concentração inicial de VB₁₂ na solução, V_0 o volume inicial, m_1 a massa de VB₁₂ absorvida na matriz do hidrogel, m_2 a massa de VB₁₂ obtida na água de lavagem e m a massa do hidrogel seco antes da absorção da vitamina.

Para os ensaios de liberação do fármaco, os hidrogéis carregados e secos, contendo VB₁₂, foram então submersos em erlenmeyers contendo 15 mL de solução de fluido gástrico (pH 1,2) ou intestinal simulado (pH 6,8) a 37 °C, mantendo-se o sistema em agitação. Em intervalos de tempo determinados, alíquotas de 2 mL da solução foram retiradas e após a determinação da concentração de VB₁₂ liberada (por UV-Vis) devolvidas ao sistema. Os experimentos foram realizados em triplicata em um intervalo de tempo total de 10 horas. A liberação acumulativa de vitamina B₁₂ para cada intervalo de tempo, foi então calculada de acordo com a equação IV.

$$\text{liberação acumulativa}(\%) = \frac{\sum C_t + C_f}{C_h} \times 100\% \quad (\text{IV})$$

Em que C_t e C_f são as concentrações de vitamina em diferentes tempos ($\mu\text{g mL}^{-1}$), e C_h é a concentração de VB₁₂ carregada no hidrogel.

Para os ensaios de liberação de fármaco, foram utilizadas curvas analíticas de padrão externo da VB₁₂ em pH 1,2 e pH 6,8.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

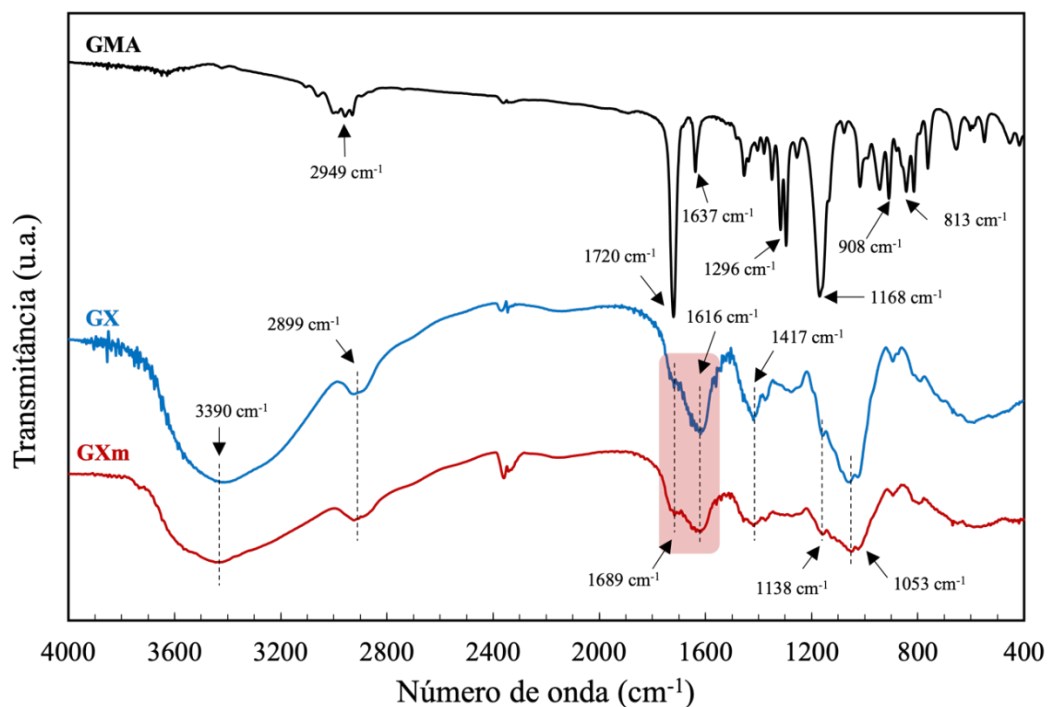
6.2.1 Modificação química da Goma Xantana

Neste trabalho, os polissacarídeos serão denominados como nativos, sempre que se encontrarem em suas formas comercialmente disponíveis.

A GX em sua forma nativa não apresenta reatividade para a formação de hidrogéis químicos sintetizados por reação de polimerização radicalar. Portanto, o polissacarídeo foi funcionalizado com a inserção de grupamentos vinílicos do GMA, segundo mecanismo apresentado no item 2.4.3.

Após a modificação química, a GXm submetida a precipitação com etanol 95 % (1 : 3 v/v), a frio, sendo o polissacarídeo então isolado por filtração. Visando confirmar a eficiência do processo de modificação da goma, foram realizadas análises de caracterização estrutural por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) das amostras de GMA, GX e GXm (Figura 30).

Figura 30. Espectros na região Infravermelho com Transformada de Fourier para as amostras GMA, GX e GXm;



Fonte: a autora.

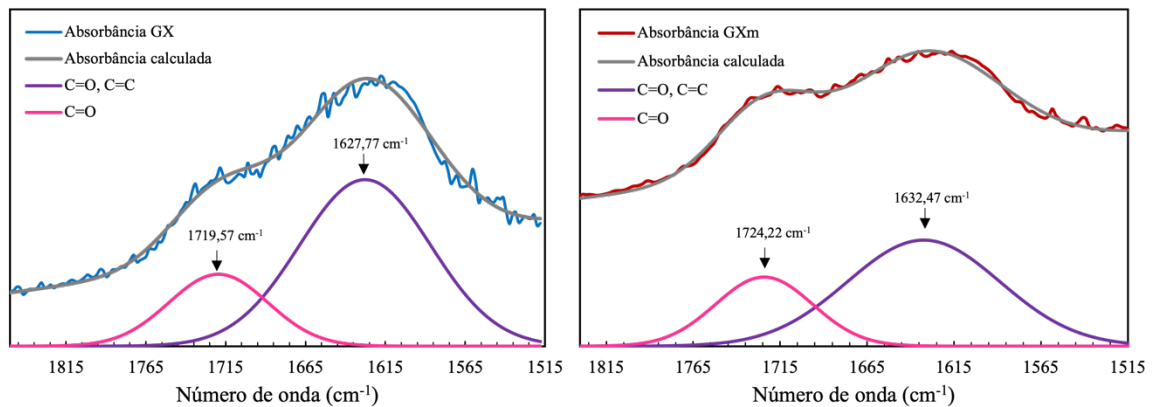
O espectro de FTIR do GMA apresenta bandas correspondentes ao anel epóxico em 813 e 908 cm^{-1} . Em 1168 e 1296 cm^{-1} , há bandas referentes às ligações éster (C-O-C). Em 1637 cm^{-1} observa-se uma banda referente às ligações de grupamento vinílico (C=C) e em 1720 cm^{-1} , há uma banda referente aos grupamentos carboxila (C=O) do GMA, sendo estas as bandas de interesse para a confirmação da reação de modificação do polissacarídeo. Em 2949 cm^{-1} observa-se uma banda correspondente à CH de grupamento CH_2 .

Para os espectros da GX e GXm podemos observar uma série de sinais característicos de polissacarídeos. As bandas em 2899 e 3390 cm^{-1} se referem respectivamente aos grupos CH e OH, enquanto as bandas em 1053 e 1138 cm^{-1} se referem à ligação C-O de acetal (anel piranosídico) e C-O-C da ligação glicosídica (LUNGAN *et al.*, 2014; REIS *et al.*, 2022). Já em 1417 e em 1616 cm^{-1} observamos duas bandas mais a carbonila de ácido carboxílico (COO^-) e em 1689 cm^{-1} referente à carbonila de éster (COOR). Quando pensamos na estrutura da goma esses sinais podem ser atribuídos as unidades de ácido glucurônico, as unidades de glucose da cadeia principal 6-*O*-acetiladas e ao grupamento acetal de ácido pirúvico (LUNGAN *et al.*, 2014; PAWLICKA *et al.*, 2019; SHAO *et al.*, 2011).

Vale ainda ressaltar que as bandas correspondentes ao anel epóxico em 813 e 908 cm^{-1} não foram observadas nos espectros de GX e GXm, indicando assim que a reação de modificação da goma com o GMA ocorreu por abertura do anel epóxico, resultando no surgimento dos derivados 3-metacrilóil-1-gliceril éter de GX e 3-metacrilóil-2-gliceril éter de GX.

A modificação química então, da GX com GMA, insere na estrutura do polissacarídeo os grupamentos C=C e C=O, cujas bandas relativas em 1637 e 1720 cm^{-1} , respectivamente, podem estar no espectro da fração GXm sobrepostas com as bandas de carbonila originalmente presentes em 1616 e 1689 cm^{-1} . Portanto, no intuito de se confirmar a presença dos grupamentos metacrilóil na estrutura da goma, realizou-se uma análise de deconvolução centrada nestes sinais nos espectros de FTIR das amostras de GX e GXm (Figura 31).

Figura 31. Gráficos de deconvolução do espectro de FTIR para as amostras de GX e GXm no intervalo de 1515 a 1830 cm^{-1} .



Fonte: a autora.

A partir da razão entre as amplitudes dos picos em aproximadamente 1630 e 1720 cm^{-1} para os espectros de ambas as amostras, é possível demonstrar que ocorreu uma alteração na intensidade relativa entre as bandas para a amostra GXm em relação a amostra GX, indicando que realmente existe uma sobreposição com as bandas oriundas do GMA, podendo-se assim confirmar que houve a modificação química da goma xantana. Os valores de amplitude dos sinais são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de número de onda e amplitude para os gráficos de absorção na região do infravermelho para as amostras de GX e GXm.

| GX | | | GXm | | |
|-------------------------------------|-----------|----------|-------------------------------------|-----------|----------|
| Número de onda (cm^{-1}) | Amplitude | σ | Número de onda (cm^{-1}) | Amplitude | σ |
| 1627,77 | 12,72 | 41,02 | 1632,47 | 8,68 | 43,94 |
| 1719,57 | 4,14 | 30,99 | 1724,22 | 3,59 | 27,88 |

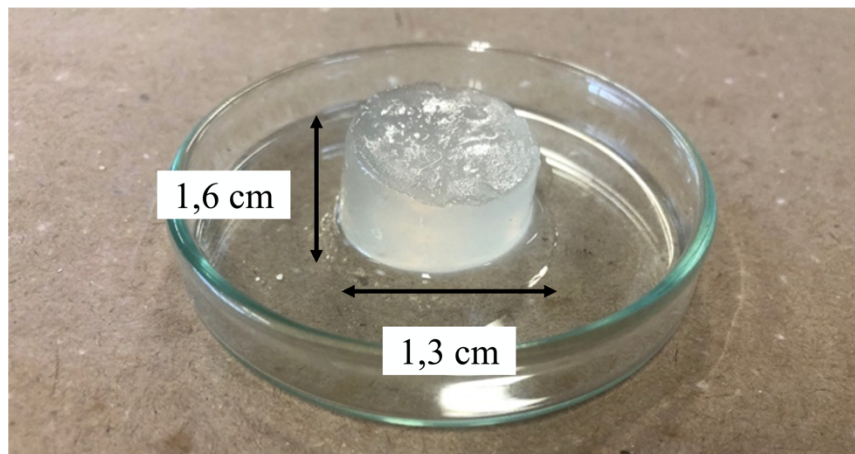
Fonte: a autora.

*Os valores foram obtidos com o ajuste entre absorvância e absorvância calculada com $R^2 = 0,990$ para GX e $R^2 = 0,994$ para GXm.

Com os valores obtidos na deconvolução, foi possível obter a razão entre as amplitudes dos picos de absorção para GX e GXm. Para GX, A_{1630}/A_{1720} foi igual a 3,07 e para GX $A_{1630}/A_{1720} = 2,42$. A diminuição da razão entre os picos indica que houve a sobreposição dos sinais de FTIR do GMA no espectro da GXm, indicando que a modificação foi efetiva, já que se trata de bandas referentes à C-O e C=C, grupamentos que foram inseridos na estrutura do polissacarídeo. Pudemos estimar que houve um grau de modificação de aproximadamente 27%, quando comparadas as razões entre as amplitudes.

Tendo em vista a mudança sutil nas bandas citadas, a eficiência do processo de modificação química da estrutura do polissacarídeo também foi confirmada mediante um teste qualitativo de síntese de um hidrogel, utilizando-se 50,0 mg do macromonômero (GXm) e 50,0 μ L de *N,N'*-dimetil-acrilamida (DMA) que atua como agente espaçador em 4,95 mL de água destilada e 17,0 mg de persulfato de potássio (agente iniciador da polimerização, baseado na presença dos grupamentos vinílicos possivelmente presentes na GXm). Uma segunda síntese foi realizada utilizando 50,0 mg do macromonômero GX, 50,0 μ L de *N,N'*-dimetil-acrilamida (DMA), 4,95 mL de água destilada e 17,0 mg de persulfato de potássio e não houve formação de hidrogel. A Figura 32 apresenta o hidrogel obtido como resultado da reticulação da GXm e da DMA, o que confirmou o sucesso na reação de modificação da GX.

Figura 32. Aspecto macroscópico do hidrogel baseado em 50,0 mg de GXm e 50,0 μ L de DMA.



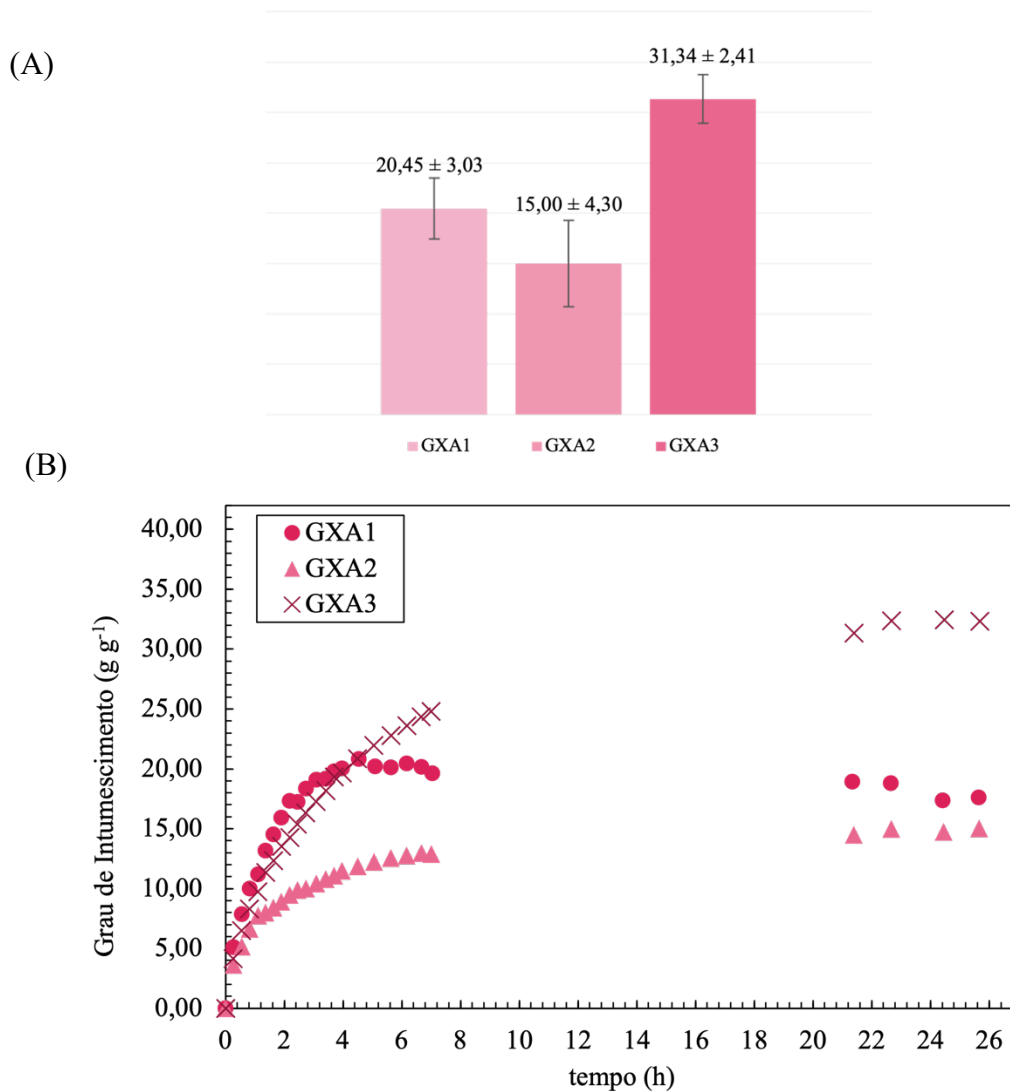
Fonte: a autora.

6.2.2 SÍNTESE DE HIDROGÉIS BASEADOS EM GXm

Os hidrogéis químicos baseados em GXm foram sintetizados de acordo com a Tabela 13 (apresentada no item 5.1.3) e a metodologia de reação de polimerização radicalar (apresentada no item 2.5), utilizando-se dois níveis GXm, sendo os hidrogéis GXA compostos por 50 mg e GXB por 80 mg de GXm. Outro fator de comparação foram os diferentes volumes utilizados do espaçador DMA. Assim, inicialmente foram então sintetizados os hidrogéis GXA1, GXA2, GXA3, GXB1, GXB2 e GXB3. Os hidrogéis obtidos foram então submetidos a ensaios de intumescimento em água destilada e os resultados de GI foram obtidos de acordo com a equação I (item 2.2).

Os hidrogéis de formulação GXA atingiram o equilíbrio em aproximadamente 20 h de ensaio e seus valores de GI no equilíbrio e o perfil geral de intumescimento estão representados na Figura 33. Como estes hidrogéis diferem apenas na quantidade de DMA, a diferença na rede tridimensional é determinada pela quantidade de espaçadores existente na matriz polimérica do hidrogel, podendo assim afetar o tamanho dos poros presentes no hidrogel e, conseqüentemente, alterar o seu comportamento de intumescimento.

Figura 33. Ensaios de intumescimento dos hidrogéis de formulação GXA1, GXA2 e GXA3 em água destilada: (A) grau de intumescimento médio no equilíbrio e (B) perfil de intumescimento.



Fonte: a autora.

Quanto à GXm presente na estrutura do hidrogel, deve-se considerar que o polissacarídeo pode ser ionizado de acordo com o pH em que se encontra devido à presença de

grupamento carboxila (-COOH) do ácido glucurônico. Portanto, em pHs inferiores a 4,5 (pKa da GX), os grupamentos carboxila e hidroxila se encontram majoritariamente protonados, aumentando a interação por ligações de hidrogênio na estrutura do hidrogel e, em pHs superiores a 4,5, os grupamentos se encontram desprotonados, de forma que o material apresenta cargas negativas e, conseqüentemente, as ligações de hidrogênio são substituídas por repulsão eletrostática.

Em água destilada, (pH 5,5), os grupamentos carboxila se encontram desprotonados. Podemos observar que o GXA3, que possui maior quantidade de DMA em sua formulação, possui o maior valor de GI no equilíbrio ($31,34 \pm 2,41 \text{ g g}^{-1}$), facilitando a entrada de água nos poros do hidrogel. Nas formulações contendo menores quantidades de DMA, há uma diminuição no valor de GI. Todos os hidrogéis sintetizados nesta etapa apresentaram uma alta fragilidade, se partindo com facilidade, e por conseqüência, resultando em possíveis desvios nas análises gravimétricas dos ensaios de intumescimento e no cálculo do GI.

Para a confirmação de que o fator “quantidade do espaçador DMA” é significativo para os resultados dos ensaios de intumescimento dos hidrogéis sintetizados, uma análise estatística ANOVA de fator único foi realizada no software Microsoft Excel® (Tabela 15). Para estas análises considerou-se os valores de GI obtidos nos experimentos de intumescimento realizados em triplicata. No teste F, quando o valor F crítico apresenta-se inferior ao valor F pudemos afirmar que existe significância na alteração do fator observado.

Tabela 15. Análise estatística ANOVA de fator único para hidrogéis de formulação GXA1, GXA2 e GXA3.

| ANOVA | | | | | | |
|--------------------------|-------------|-----------|------------|-------------|----------------|------------------|
| <i>Fonte de variação</i> | <i>SQ</i> | <i>gl</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>valor P</i> | <i>F crítico</i> |
| Entre grupos | 415,3801504 | 2 | 207,690075 | 18,62323286 | 0,00267056 | 5,14325285 |
| Dentro de grupos | 66,91321859 | 6 | 11,1522031 | | | |
| Total | 482,293369 | 8 | | | | |

Fonte: a autora.

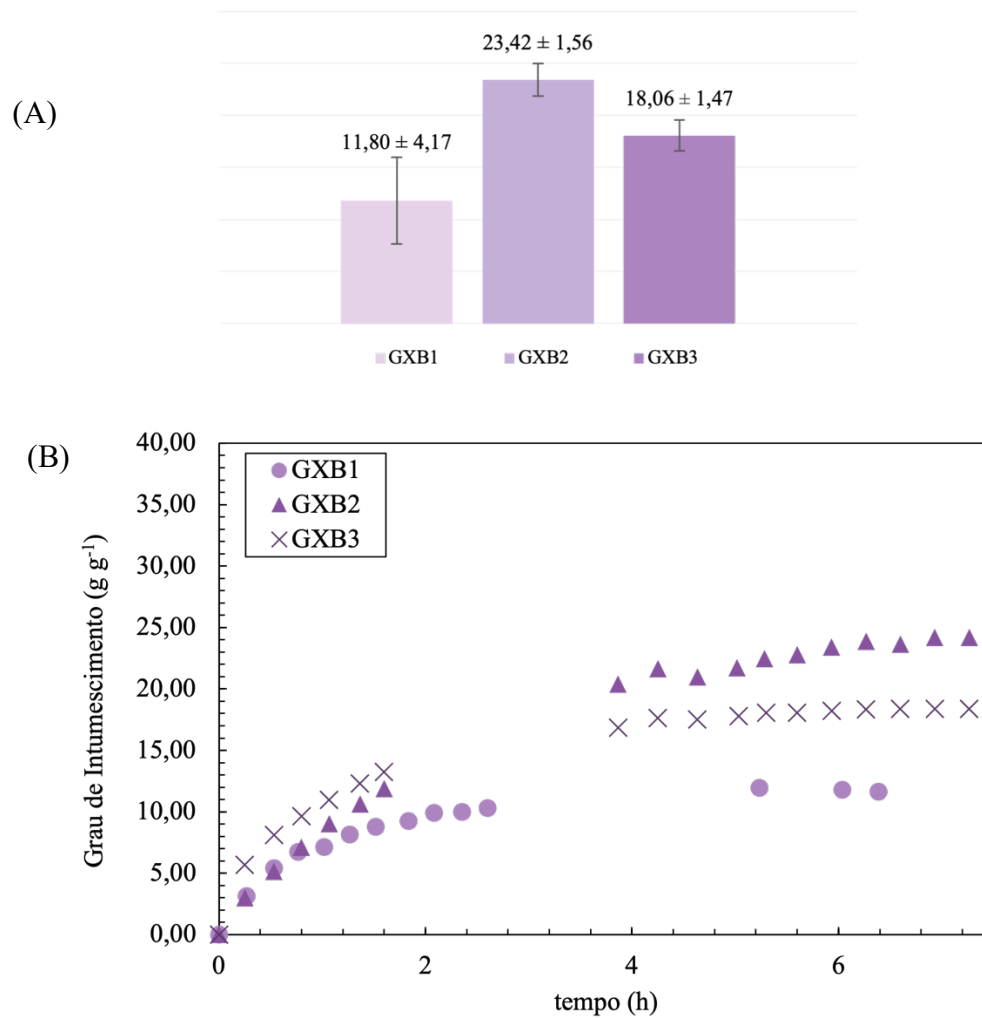
O resultado observado no teste ANOVA confirma que o fator DMA é significativo para a variação do GI. Experimentalmente também foi observado que a variação da quantidade de agente espaçador influencia na estabilidade do gel formado, sendo hidrogéis com formulações de menor quantidade de DMA mais frágeis.

Para uma análise da diferença estatística entre os hidrogéis de formulação GXA1, GXA2 e GXA3 realizou-se o teste T de Student, de forma que os valores de p-value obtidos definiram os hidrogéis GXA1 e GXA2 como estatisticamente iguais. Os valores obtidos no teste T estão apresentados no anexo I.

Já em relação aos hidrogéis contendo 80 mg de GXm, foi possível observar que o hidrogel de formulação GXB1 apresentou um menor GI no equilíbrio ($11,80 \pm 4,17 \text{ g g}^{-1}$ - Figura 34), sendo esta a formulação que apresenta menor quantidade do espaçador DMA, diminuindo assim o espaço entre as cadeias poliméricas e dificultando a entrada da água destilada nos poros do material. Já os hidrogéis GXB2 e GXB3, com maiores quantidades de DMA apresentaram uma inversão no comportamento de intumescimento, em relação ao que seria esperado e seus valores de GI no equilíbrio indicam esse fenômeno ($23,42 \pm 1,56$ e $18,06 \pm 1,47 \text{ g g}^{-1}$, respectivamente). Como nos hidrogéis de formulação GXA, esperava-se que o aumento da quantidade de DMA na formulação aumentasse o espaçamento entre as cadeias poliméricas e, conseqüentemente, aumentasse o valor de GI encontrado, mas o inverso foi observado, ou seja, com uma maior quantidade de GXm acrescentada juntamente com a DMA, o grau de reticulação do hidrogel aumenta, dificultando o afastamento das cadeias poliméricas para a entrada do fluido para o interior da matriz do material.

Utilizando como parâmetro os resultados de teste F, podemos observar que o valor de F é superior ao valor de F crítico, indicando que há significância na alteração do parâmetro DMA, influenciando no valor de GI obtido. Para a análise da diferença estatística dos valores de GI obtidos para os hidrogéis de formulação GXB, foi realizado o teste T de Student, em que as formulações GXB1 e GXB3 apresentaram-se estatisticamente iguais (anexo I). Isto demonstra que, entre as formulações testadas, a formulação com potencial de obtenção de maior valor de GI no equilíbrio para hidrogéis utilizando 80 mg de GXm é a formulação GXB2.

Figura 34. Ensaio de intumescimento dos hidrogéis de formulação GXB1, GXB2 e GXB3 em água destilada: (A) grau de intumescimento médio no equilíbrio e (B) perfil de intumescimento.



Fonte: a autora.

Tabela 16. Análise estatística ANOVA de fator único para hidrogéis de formulação GXB1, GXB2 e GXB3.

| ANOVA | | | | | | |
|-------------------|------------|-----------|------------|-----------|----------------|------------------|
| Fonte de variação | <i>SQ</i> | <i>gl</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | valor <i>P</i> | <i>F crítico</i> |
| Entre grupos | 202,870911 | 2 | 101,435456 | 13,643779 | 0,00585609 | 5,14325285 |
| Dentro de grupos | 44,6073433 | 6 | 7,43455721 | | | |
| Total | 247,478254 | 8 | | | | |

Fonte: a autora.

A partir dos resultados estatísticos, é possível afirmar que o hidrogel de formulação GXB1 obteve seu GI relativo à uma estrutura com formação de poros menores devido à menor quantidade de DMA acrescentada. A formulação GXB3 também teve seu valor de GI diminuído, porém devido ao aumento da densidade de reticulações na matriz do hidrogel, já que há uma maior massa de DMA acrescentada, o que dificulta o espaçamento das cadeias poliméricas para o intumescimento.

A partir do perfil de intumescimento dos hidrogéis (Figura 33 e Figura 34), foi possível utilizar a porção de crescimento linear dos valores de GI (aproximadamente 60% do valor do GI no equilíbrio) para o cálculo do mecanismo de intumescimento através de um ajuste à Lei da Potência (equação II). Os resultados encontrados para o expoente de difusão (n) indicam diferentes mecanismos de intumescimento para as formulações estudadas, conforme apresentado na Tabela 17.

Tabela 17. Mecanismo de intumescimento em água destilada de hidrogéis baseados em GX.

| Hidrogel | GI (g g ⁻¹) | Expoente de Difusão (n) | Mecanismo |
|----------|-------------------------|-----------------------------|--------------------|
| GXA1 | 20,45 ± 3,03 | 0,48 | Transporte anômalo |
| GXA2 | 15,00 ± 4,30 | 0,40 | Difusão Fickiana |
| GXA3 | 31,34 ± 2,41 | 0,52 | Transporte anômalo |
| GXB1 | 11,80 ± 4,17 | 0,52 | Transporte anômalo |
| GXB2 | 23,42 ± 1,56 | 0,65 | Transporte anômalo |
| GXB3 | 18,06 ± 1,47 | 0,40 | Difusão Fickiana |

Fonte: a autora.

Os hidrogéis de formulação GXA1 e GXA3 apresentaram um mecanismo de transporte anômalo, em que há contribuição do intumescimento a partir da difusão Fickiana e de relaxação macromolecular. Para o hidrogel GXA2, observou-se apenas o mecanismo de difusão Fickiana. Como os hidrogéis de formulação GXA1 e GXA2 são estatisticamente iguais, a diferença no mecanismo de transporte pode ser resultante dos desvios encontrados durante o experimento, já que as formulações apresentaram certa fragilidade física para sua manipulação.

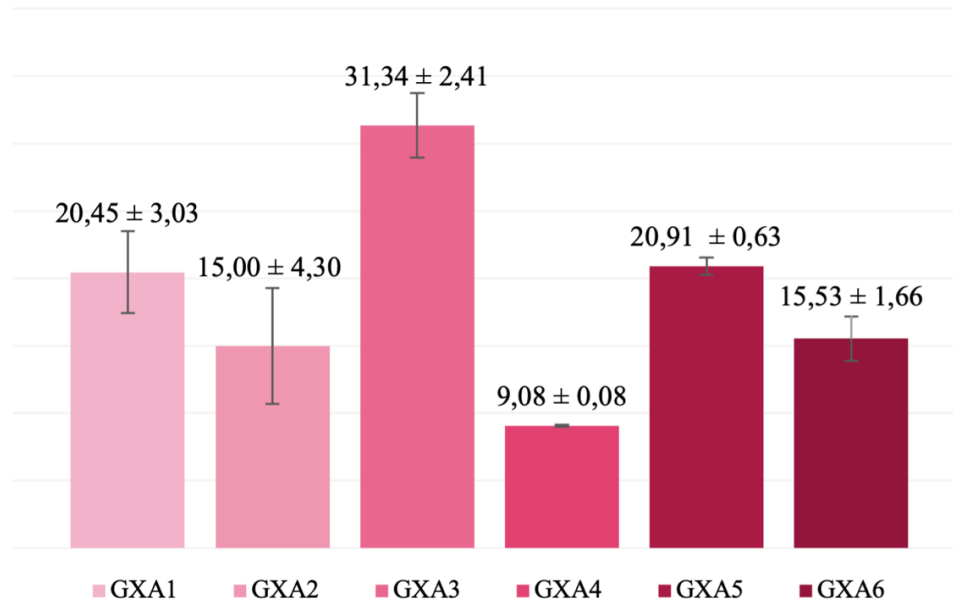
Já os hidrogéis de formulação GXB1 e GXB2 tiveram um mecanismo de intumescimento caracterizado pelo transporte anômalo. Uma maior quantidade de GXm acrescentada no material em relação aos hidrogéis de formulação GXA aumenta a contribuição da relaxação macromolecular no hidrogel devido ao aumento da quantidade de cargas negativas

na matriz polimérica do material. O hidrogel GXB3, por sua vez, apresenta uma maior quantidade de espaçador em relação aos outros materiais, podendo distanciar as cargas negativas presentes no material e, conseqüentemente, reduzir a contribuição da repulsão eletrostática que facilita o afastamento das cadeias, resultando em um mecanismo de difusão Fickiana, justificando um menor valor de GI em relação ao hidrogel GXB2.

Após a análise dos resultados, foi realizada a síntese de hidrogéis com três novas formulações. Os hidrogéis foram sintetizados por meio de reação de reticulação via radicalar. Para tanto, diferentes formulações foram produzidas utilizando a GXm como macromonômero e a N',N'-dimetil-acrilamida (DMA) como agente espaçador, conforme apresentado na Tabela 13 (GXA4 (0,15 mL DMA), GXA5 (0,20 mL DMA) e GXA6 (0,25 mL DMA)). Para a síntese, após a homogeneização dos reagentes GX e DMA, aqueceu-se o sistema até a temperatura de 60 °C, sob agitação magnética. Após o aquecimento, adicionou-se 17,0 mg do iniciador persulfato de potássio em meio reacional. Os hidrogéis foram sintetizados em volume total de 5,0 mL, utilizando-se água destilada como solvente e formando um material cilíndrico, uma vez que foram polimerizados em béqueres. Após a síntese, os hidrogéis foram secos em estufa à temperatura média de 50 °C.

A massa de GXm acrescentada foi definida de acordo com a solubilidade do material em água destilada, e a DMA foi acrescentada de forma a diminuir a fragilidade dos hidrogéis sintetizados. A formulação GXA foi escolhida como parâmetro para a síntese de novos hidrogéis devido à menor massa de GXm acrescentada, o que diminui a viscosidade da solução utilizada para a síntese do hidrogel, bem como a densidade das cadeias poliméricas. Com uma maior quantidade de GXm na formulação, há um aumento das ligações cruzadas e, conseqüentemente, uma diminuição no GI dos hidrogéis. Os resultados de ensaio de intumescimento em água destilada são apresentados na Figura 35.

Figura 35. Valores obtidos de grau de intumescimento no equilíbrio em água destilada para os hidrogéis de formulação GXA.



Fonte: a autora.

Assim, os novos hidrogéis produzidos apresentaram um aspecto macroscópico mais estável em resposta ao aumento das quantidades do espaçador DMA utilizados, sendo que, quanto maior a quantidade de espaçador acrescentado, menor a fragilidade observada do material. Como mostra a Figura 35, estas novas formulações de hidrogéis apresentaram, contudo, menores valores de GI, quando comparados aos hidrogéis GXA1 e GXA3. Estes resultados podem ser atribuídos a uma maior reticulação da matriz polimérica que resulta em uma menor resposta às interações eletrostáticas, consequentemente dificultando a absorção de água pelo material. A maior densidade de reticulação (grau de reticulação) também pode dificultar o afastamento das cadeias poliméricas, refletindo nos valores encontrados de GI.

Tendo em vista que os hidrogéis de formulação GXA3, GXA4, GXA5 e GXA6 apresentaram, de modo geral, resultados promissores em questão à menor fragilidade do material e maiores valores de GI e foram estatisticamente diferentes (valores obtidos para o teste T de Student estão apresentados no anexo I), utilizou-se destas formulações para um estudo aprofundado de seu mecanismo de intumescimento em água destilada.

Para definir o valor do coeficiente de difusão e, consequentemente, do mecanismo de transporte, utilizou-se a linearização da equação da Lei da Potência para aproximadamente 60%

do valor de GI no equilíbrio. Os valores de GI em função do tempo foram ajustados de acordo com uma função Weibull de acordo com a equação:

$$\frac{m_t}{m_{eq}} = (1 - e^{-kt^d}) \quad (V)$$

Onde que m_t é a massa do hidrogel em determinado tempo, m_{eq} a massa do hidrogel no equilíbrio, t o tempo e k e d são constantes, sendo k a constante relacionada diretamente com a velocidade de intumescimento em água destilada.

Os valores encontrados para o coeficiente n e constante k da Lei da Potência e as constantes k e d do ajuste Weibull estão representados na Tabela 18 abaixo.

Tabela 18. Valores obtidos através do ajuste da Lei da Potência e Ajuste Weibull para os hidrogéis de formulação GXA3, GXA4, GXA5 e GXA6.

| | Mecanismo de transporte | | | Ajuste Weibull | | |
|------|-------------------------|------|-------------------------|----------------|-------|-------|
| | n | k | Mecanismo de Transporte | k | d | R^2 |
| GXA3 | 0,52 | 1,16 | Transporte anômalo | 0,366 | 0,745 | 0,996 |
| GXA4 | 0,41 | 1,36 | Difusão Fickiana | 0,329 | 0,660 | 0,969 |
| GXA5 | 0,53 | 1,16 | Transporte anômalo | 0,958 | 0,762 | 0,998 |
| GXA6 | 0,43 | 0,82 | Difusão Fickiana | 0,721 | 0,695 | 0,991 |

Fonte: a autora.

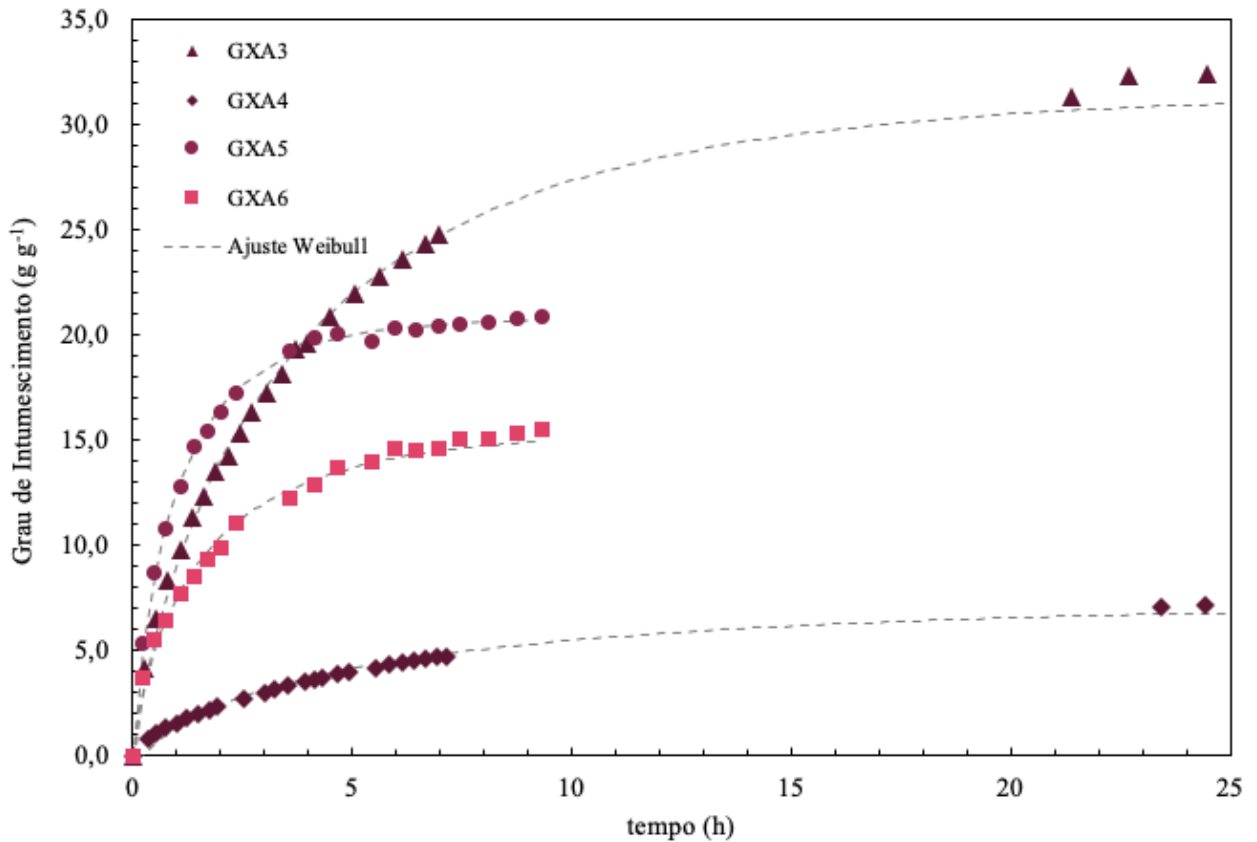
*Os coeficientes de difusão (n) estão associados ao mecanismo de transporte considerando hidrogéis de formato cilíndrico.

Podemos observar que o mecanismo de transporte da água no hidrogel variou de acordo com a formulação, sendo que os hidrogéis que apresentaram menor GI (GXA4 e GXA6) apresentaram um mecanismo de intumescimento que prevaleceu a difusão Fickiana. Para os hidrogéis de maior GI (GXA3 e GXA5), o mecanismo de transporte foi o transporte anômalo, indicando que, além da difusão Fickiana, também há a contribuição da relaxação macromolecular no processo de intumescimento. O perfil de intumescimento dos hidrogéis estão representados na Figura 36.

Relacionando os valores obtidos da constante k do ajuste Weibull (Tabela 17) com o perfil de intumescimento apresentado na Figura 36, podemos observar que os hidrogéis que entraram em equilíbrio em tempos menores obtiveram um maior valor da constante k , que é relacionada à cinética da difusão. O hidrogel de formulação GXA5 ($k = 0,958 \text{ h}^{-d}$, em que d é a constante encontrada pelo ajuste Weibull) obteve o maior valor de k e atingiu o equilíbrio em aproximadamente 3 h. Já o hidrogel de formulação GXA6 ($k = 0,721 \text{ h}^{-d}$), com um valor de k

menor que o obtido para GXA5, atingiu o equilíbrio em aproximadamente 5 h. As demais formulações apresentaram valores próximos de k , atingindo o equilíbrio em 15 h.

Figura 36. Perfil de intumescimento para os hidrogéis de formulação GXA3, GXA4, GXA5 e GXA6 com ajuste da função Weibull.



Fonte: a autora.

Sabendo-se que o transporte anômalo possui contribuições significativas de difusão Fickiana e relaxação macromolecular para o transporte da água, é necessário calcular a contribuição de cada mecanismo para o mecanismo geral. Peppas e Sahlin (1989) descreveram a equação abaixo, que considera os valores da massa do hidrogel em determinado tempo (m_t), a massa do hidrogel no equilíbrio (m_{eq}), o tempo (t) e as constantes de difusão (k_d) e relaxação (k_r), para o transporte anômalo, considerando valores até aproximadamente 60% do GI no equilíbrio.

$$\frac{m_t}{m_{eq}} = k_d t^{0,5} + k_r t \quad (VI)$$

A partir dos resultados obtidos das constantes de difusão e relaxação macromolecular pelo ajuste de Peppas-Sahlin (1989), é possível calcular a porcentagem da contribuição da difusão Fickiana (F) para o mecanismo geral pela Equação:

$$F = \frac{1}{1 + \frac{k_r}{k_d} t^{0.5}} \quad (\text{VII})$$

e a porcentagem de relaxação macromolecular (R) é obtida pela equação $R=1-F$.

Considerando que apenas os hidrogéis de formulação GXA3 e GXA5 apresentaram um mecanismo de transporte anômalo para o intumescimento em água destilada, calculou-se as constantes k_d e k_r , e os valores estão representados na Tabela 19 abaixo:

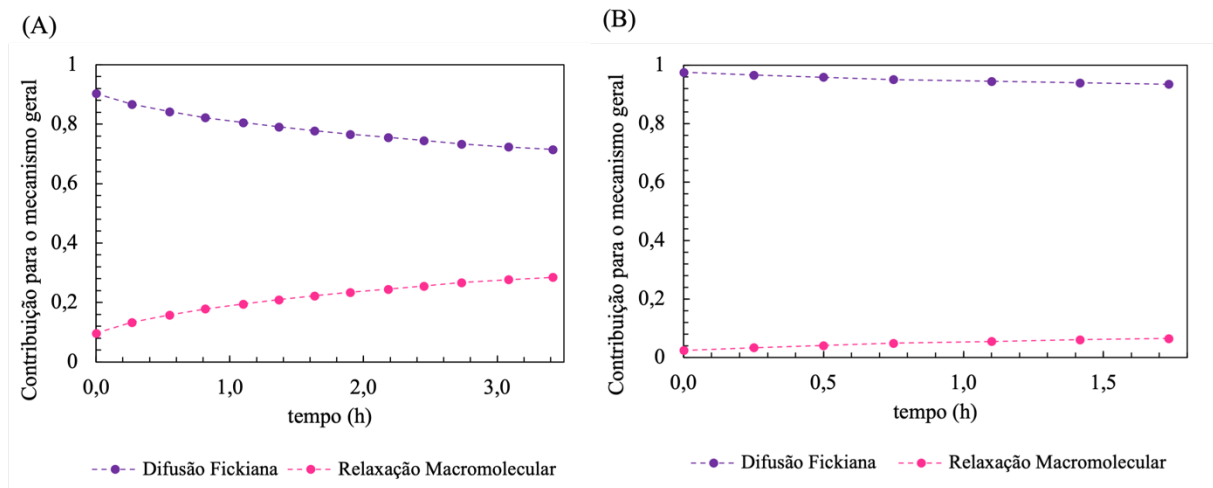
Tabela 19. Valores das constantes de difusão Fickiana e relaxação macromolecular para os hidrogéis de formulação GXA3 e GXA5 em ensaios de intumescimento em água destilada.

| | k_d (h ^{-0,5}) | k_r (h ⁻¹) | R ² |
|------|----------------------------|--------------------------|----------------|
| GXA3 | 0,476 | 0,023 | 0,968 |
| GXA5 | 0,210 | 0,044 | 0,977 |

Fonte: a autora.

Com os valores das constantes k_d e k_r encontrados, é possível notar que o mecanismo de transporte anômalo para os dois hidrogéis estudados apresentam uma maior contribuição da difusão Fickiana em relação à relaxação macromolecular. Com as constantes calculadas, foi possível obter os valores de F (contribuição da difusão Fickiana) e R (contribuição da relaxação macromolecular) em determinados tempos e, assim, encontrar o perfil da contribuição dos mecanismos para o mecanismo geral de intumescimento dos hidrogéis GXA3 e GXA5, sendo este representado na Figura 37.

Figura 37. Contribuição dos mecanismos de difusão Fickiana e relaxação macromolecular para o mecanismo geral de transporte de água para os hidrogéis GXA3 (A) e GXA5 (B).



Fonte: a autora.

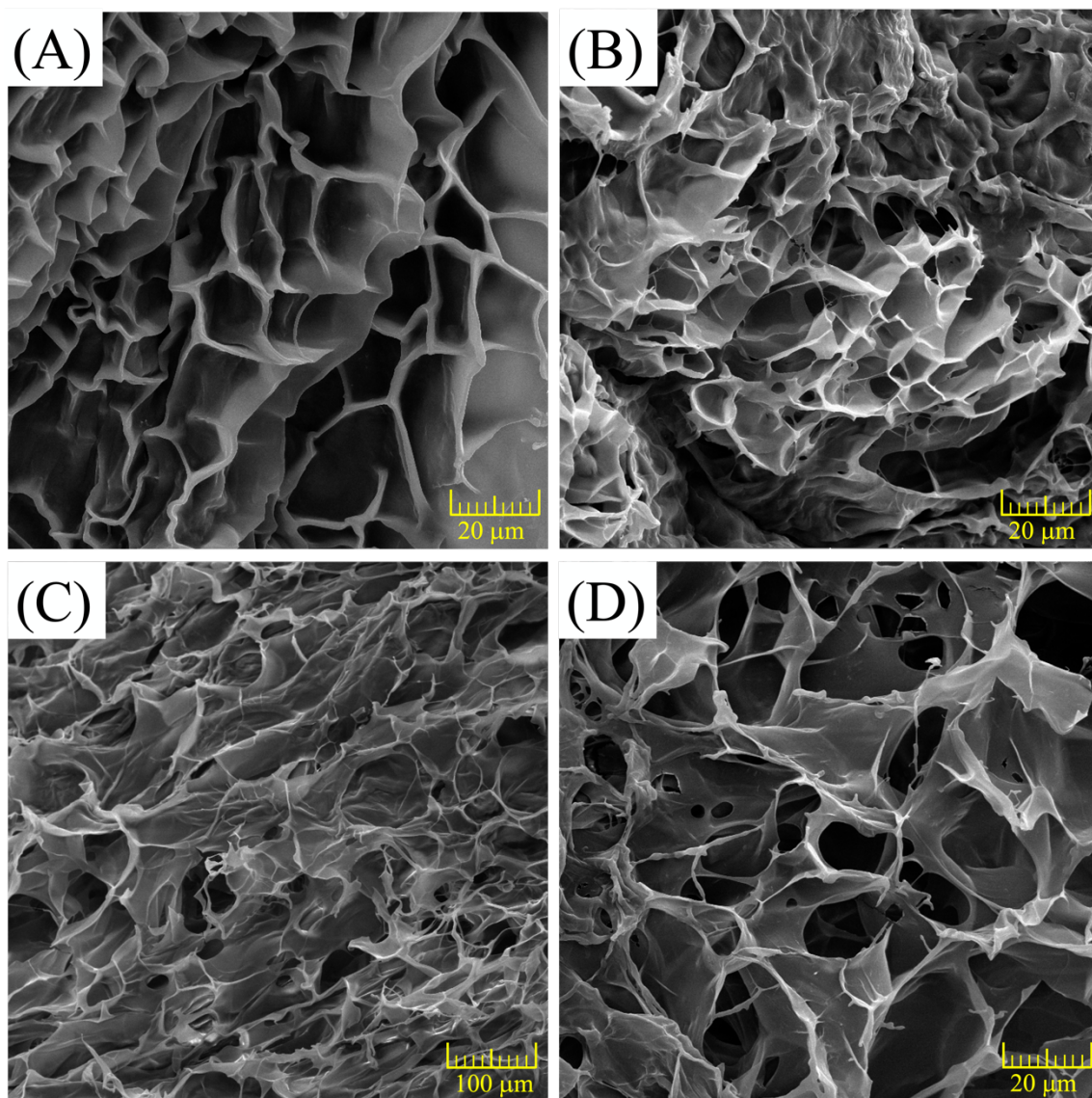
Desta forma, podemos observar que o hidrogel de formulação GXA3 apresentou inicialmente maior contribuição da difusão Fickiana (aproximadamente 90% da contribuição para o mecanismo geral) e, com o passar do tempo, a contribuição diminuiu para aproximadamente 80%. O aumento da contribuição da relaxação macromolecular refletiu nos valores encontrados de GI no equilíbrio, já que o aumento deste mecanismo resulta no maior afastamento das cadeias poliméricas, o que reflete na maior facilidade de entrada do fluido na matriz polimérica.

Já o hidrogel de formulação GXA5 apresentou menor valor de GI no equilíbrio quando comparado com o hidrogel GXA3. Estes valores podem ser justificados por uma baixa contribuição da relaxação macromolecular, já que o transporte da água para a matriz do hidrogel é realizada prioritariamente por difusão Fickiana (aproximadamente 90% da contribuição para o mecanismo geral). O perfil de contribuição dos mecanismos refletiu os valores de constantes encontrados, já que, para GXA3, a razão entre os valores de k_r encontrado em relação a k_d é superior quando comparados aos valores obtidos para o hidrogel GXA5.

Além da contribuição dos mecanismos de transporte, a absorção de água destilada nos hidrogéis ocorre também por meio dos poros presentes na matriz polimérica tridimensional do material. Para confirmar a morfologia interna desses hidrogéis, após o intumescimento destes em água destilada, foram congelados com nitrogênio líquido, liofilizados e submetidos a análise de Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG). A Figura 38 permite observar a estrutura interna porosa dos hidrogéis GXA3, GXA4, GXA5 e GXA6, que

se assemelha a uma colmeia, confirmando que a reação de reticulação do hidrogel forma uma rede tridimensional polimérica, em que a água ou fluido é retido nas vacâncias presentes no material.

Figura 38. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para os hidrogéis GXA3 (A), GXA4 (B), GXA5, (C) e GXA6 (D) após atingir o equilíbrio de intumescimento em água destilada.



Fonte: a autora.

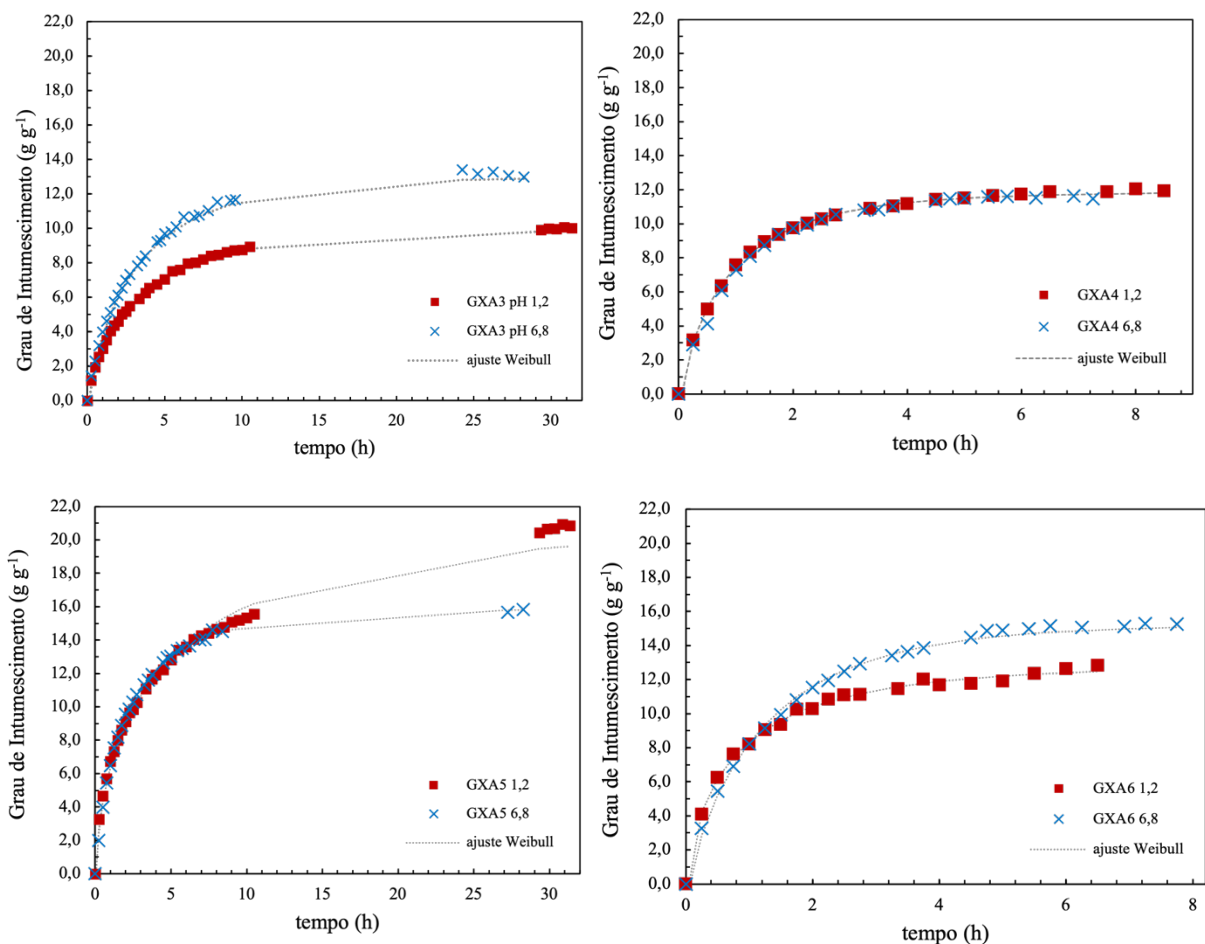
6.2.3 *pH-responsividade de hidrogéis baseados em GXm*

A partir dos estudos de intumescimento em água destilada, selecionou-se para os ensaios de intumescimento em soluções tampão pH 1,2 e 6,8, apenas os hidrogéis GXA3, GXA4,

GXA5 e GXA6, por se tratar das formulações já apresentaram menor fragilidade ao manuseio, mas principalmente por serem estas as formulações que apresentaram resultados estatísticos satisfatórios. Os ensaios em solução tampão foram realizados em dois diferentes valores de pH a fim de se avaliar a pH-responsividade dos materiais. Da mesma forma, visando analisar se estes hidrogéis poderiam ser utilizados como veículos para a liberação controlada de fármacos os ensaios foram realizados em condições gastrointestinais simuladas com controle de temperatura à 37 °C.

Os perfis de intumescimentos para os hidrogéis em solução tampão estão representados na Figura 39. Os resultados de GI em determinados tempos foram ajustados pela função Weibull descrita na equação V.

Figura 39. Perfil de intumescimento em soluções tampão de pH 1,2 e 6,8 para os hidrogéis GXA3 (A), GXA4 (B), GXA5 (C) e GXA6 (D).



Fonte: a autora.

Conforme pode ser observado nos gráficos de perfil de intumescimento, os hidrogéis GX3 e GX6 foram os que apresentaram melhor pH-responsividade. Para o hidrogel GXA3 no equilíbrio, observou-se um valor de GI de aproximadamente 10 g g^{-1} em pH 1,2 e 13 g g^{-1} em pH 6,8, enquanto que para o hidrogel GXA6, observou-se um valor de GI próximo a 13 g g^{-1} em pH 1,2 e 15 g g^{-1} em pH 6,8. Desta forma, ambas as formulações atingiram maiores valores de GI no pH 6,8.

Para os hidrogéis GXA4 e GXA5, não foi observado perfil pH-responsivo. Este fato pode ser atribuído aos elevados valores de desvio padrão determinados ao longo do experimento, especialmente em solução pH 1,2, como resultado de uma parcial degradação da matriz dos hidrogéis neste pH, mas também pela quantidade do espaçador DMA utilizada nas duas formulações que, a depender de sua concentração e padrão de polimerização, podem ter influenciado de forma a resistir ao efeito das ligações de hidrogênio (em pH 1,2) ou da repulsão eletrostática (pH 6,8) no processo de intumescimento dos hidrogéis.

O comportamento pH-responsivo esperado em hidrogéis a base de goma xantana, pode ser explicado pela presença dos grupamentos carboxila em sua estrutura, o que confere a este biopolímero um valor de pKa próximo a 4,5. Em solução tampão pH 1,2 então, os grupamentos carboxila se encontram protonados, o que aumenta a interação intermolecular por ligações de hidrogênio, permitindo uma aproximação das cadeias poliméricas. Esta aproximação afeta diretamente o valor de GI encontrado, já que o menor afastamento das cadeias poliméricas pode diminuir o tamanho dos poros do hidrogel, dificultando a entrada do fluido na matriz do hidrogel. Já em solução tampão de pH 6,8, os grupamentos carboxila se encontram desprotonados e, conseqüentemente, ionizados na forma do carboxilato. Esta condição iônica do polissacarídeo resulta no aumento da repulsão eletrostática e no afastamento das cadeias poliméricas, facilitando a entrada do fluido na matriz do hidrogel. Desta forma justifica-se os melhores valores de GI observados pelos hidrogéis GXA3 e GXA6 no pH 6,8.

Nota-se ainda que a formulação GXA6, que contém maior quantidade de DMA, apresentou também um maior valor de GI no equilíbrio. Como a DMA atua como espaçador da rede tridimensional polimérica, o aumento em sua concentração tende também a causar um aumento do tamanho dos poros obtidos nos hidrogéis, facilitando a entrada da água para a matriz.

Para os estudos do mecanismo de transporte utilizou-se da lei da potência para aproximadamente 60% do valor de GI no equilíbrio, e os valores para ensaios em pH 1,2 estão descritos na Tabela 20 e em pH 6,8 na Tabela 21.

Tabela 20. Valores de GI no equilíbrio e coeficiente de difusão (n) para os hidrogéis GXA3, GXA4, GXA5 e GXA6 em soluções tampão de pH 1,2.

| | GI | n | k | Mecanismo de transporte |
|-----|----------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------|
| GX3 | 10,005 ± 1,166 | 0,46 | 0,996 | Transporte anômalo |
| GX4 | 11,938 ± 0,619 | 0,58 | 0,382 | Transporte anômalo |
| GX5 | 20,863 ± 0,009 | 0,42 | 1,099 | Difusão Fickiana |
| GX6 | 12,842 ± 0,003 | 0,42 | 0,396 | Difusão Fickiana |

Fonte: a autora.

Tabela 21. Valores de GI no equilíbrio e coeficiente de difusão (n) para os hidrogéis GXA3, GXA4, GXA5 e GXA6 em soluções tampão de pH 6,8.

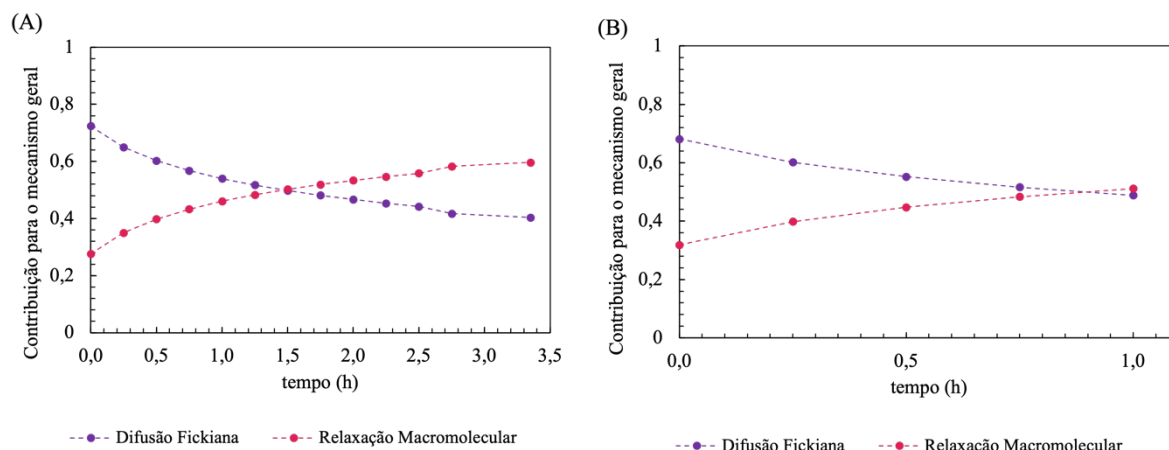
| | GI | n | k | Mecanismo de transporte |
|-----|----------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------|
| GX3 | 12,984 ± 0,480 | 0,52 | 1,002 | Transporte anômalo |
| GX4 | 11,795 ± 1,201 | 0,56 | 0,453 | Transporte anômalo |
| GX5 | 15,816 ± 2,464 | 0,68 | 0,794 | Transporte anômalo |
| GX6 | 15,244 ± 0,174 | 0,54 | 0,573 | Transporte anômalo |

Fonte: a autora.

Em solução tampão de pH 1,2, os hidrogéis GX3 e GX4 apresentaram mecanismo de transporte anômalo e os hidrogéis GX5 e GX6 apresentaram mecanismo de difusão Fickiana. Em solução tampão de pH 6,8, todos os hidrogéis apresentaram um mecanismo de transporte anômalo. Esta mudança no mecanismo de intumescimento indica que há interação entre a matriz polimérica e o solvente utilizado no processo de intumescimento.

A partir da Equação, de Peppas-Sahlin (1989), foi possível calcular os valores das constantes k_d e k_r para o mecanismo de transporte anômalo dos hidrogéis de formulação GXA3 e GXA4 em solução tampão de pH 1,2. Os valores de k_d são de 0,1069 h^{-0,5} para o hidrogel de formulação GXA3 e 0,2573 h^{-0,5} para GXA4 e de k_r 0,0815 h⁻¹ e 0,2409 h⁻¹ para GXA3 e GXA4, respectivamente. Com os valores das constantes de difusão e relaxação, obteve-se o perfil de contribuição dos mecanismos para o mecanismo geral em determinados tempos, em valores de até aproximadamente 60% do valor de GI no equilíbrio, e estão ilustrados na Figura 40.

Figura 40. Contribuição da difusão Fickiana e relaxação macromolecular para o mecanismo de transporte anômalo dos hidrogéis GXA3 (A) e GXA4 (B) em ensaios de intumescimento de solução tampão de pH 1,2, a 37 °C.



Fonte: a autora.

Assim, podemos notar que inicialmente a difusão Fickiana possui maior contribuição para as duas formulações analisadas. Contudo com o decorrer do tempo, há uma tendência da inversão do mecanismo, com uma maior contribuição da relaxação macromolecular. Esta mudança ocorre mais rapidamente no hidrogel que possui maior quantidade de espaçador DMA, o GXA4, uma vez que há um maior afastamento entre os grupamentos carboxílicos (-COOH), diminuindo assim a contribuição da ligação de hidrogênio e permitindo que ocorra a relaxação das cadeias com maior facilidade.

No caso das formulações GXA5 e GXA6, a difusão se torna o principal contribuinte do mecanismo, já que o grau de reticulação das cadeias poliméricas é maior, influenciando na interação com o solvente e diminuindo a relaxação das cadeias poliméricas.

Para os ensaios de intumescimento em solução tampão de pH 6,8, todos os hidrogéis apresentaram o mecanismo de transporte anômalo, devido à ionização dos grupamentos carboxilato. Para tanto, os valores da constante k_r e k_d foram calculados de acordo com o ajuste de Peppas-Sahlin (1989) e apresentados na Tabela 22.

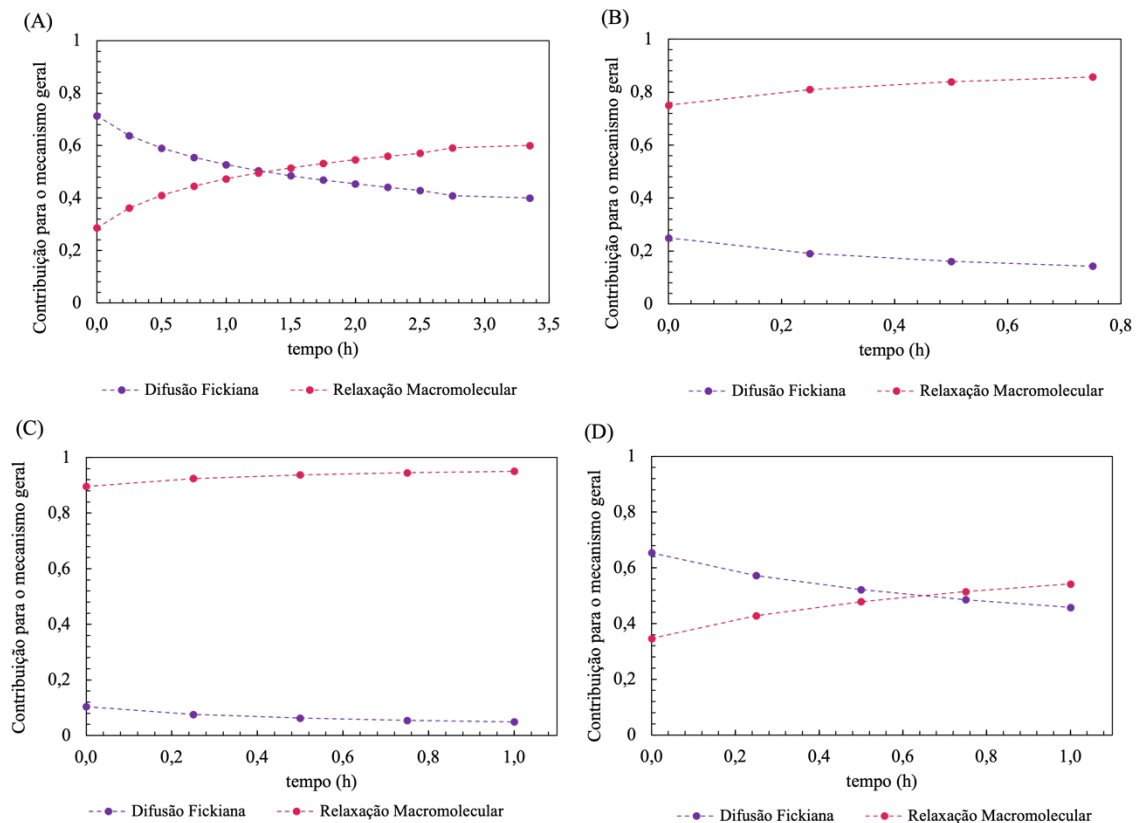
Tabela 22. Valores das constantes de difusão Fickiana e relaxação para o mecanismo de transporte anômalo em ensaios de intumescimento em solução tampão de pH 6,8 para os hidrogéis de formulação GXA3, GXA4, GXA5 e GXA6.

| | k_d ($\text{h}^{-0,5}$) | k_r (h^{-1}) | R^2 |
|------|-----------------------------|---------------------------|-------|
| GXA3 | 0,115 | 0,092 | 0,965 |
| GXA4 | 0,073 | 0,437 | 0,965 |
| GXA5 | 0,018 | 0,305 | 0,984 |
| GXA6 | 0,212 | 0,224 | 0,976 |

Fonte: a autora.

Com os valores da constante de difusão e relaxação, foi possível analisar o perfil da contribuição dos mecanismos para valores até aproximadamente 60% dos valores de GI no equilíbrio, apresentados na Figura 41.

Figura 41. Perfil de contribuição para o mecanismo de transporte anômalo para os ensaios de intumescimento dos hidrogéis de formulação GXA3 (A), GXA4 (B), GXA5 (C) e GXA6 (D) em ensaios de intumescimento em solução tampão de pH 6,8 a 37 °C.



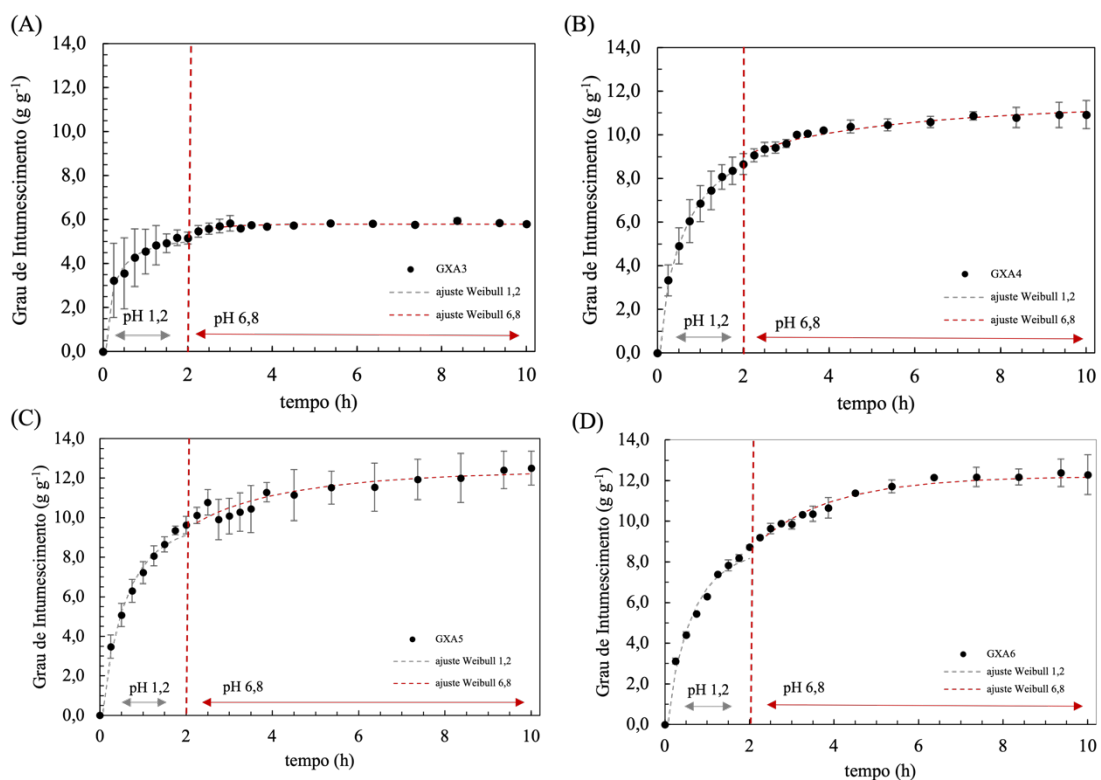
Fonte: a autora.

Os hidrogéis de formulação GXA5 e GXA6 apresentaram um mecanismo de difusão Fickiana em solução de pH 1,2, porém em pH 6,8 houve uma mudança no mecanismo de transporte, sendo observado uma maior contribuição para a relaxação macromolecular em todo processo de intumescimento para o hidrogel de formulação GXA5. Já para o hidrogel de formulação GXA6, o mecanismo de transporte se inicia com maior contribuição da difusão e, após aproximadamente 40 minutos, há a alteração para o mecanismo de relaxação.

Uma vez caracterizado o perfil e o comportamento dos hidrogéis em resposta a duas condições distintas de pH, um novo ensaio de pH-responsividade foi realizado. É sabido que durante o processo de liberação de fármacos, ocorre o trânsito do dispositivo de transporte do fármaco ao longo do sistema digestório. Assim, a fim de simular o perfil de intumescimento

destes hidrogéis em condições de pH mais próximas ao que seria observado no sistema gastrointestinal real, realizou-se ensaios de intumescimento em solução tampão pH 1,2 (fluido gástrico simulado) por duas horas seguido por intumescimento em solução tampão pH 6,8 (fluido intestinal simulado) pelas próximas oito horas, sob temperatura de 37 °C, conforme a metodologia adaptada descrita por Reis et al., 2022. Os perfis de intumescimento para os hidrogéis GXA3, GXA4, GXA5 e GXA6 podem ser observados na Figura 42.

Figura 42. Perfil de intumescimento para os hidrogéis de formulação GXA3 (A), GXA4 (B), GXA5 (C) e GXA6 (D) em sistema gastrointestinal simulado.



Fonte: a autora.

Para os ensaios de liberação controlada de fármaco, espera-se que os hidrogéis sejam capazes de intumescer em solução tampão de pH 1,2 mas que continuem a intumescer quando a matriz é inserida na solução de pH 6,8. Normalmente espera-se que a maior taxa de liberação de fármaco ocorra no intestino (pH 6,8), local então onde o hidrogel deveria apresentar maiores valores de GI. No caso dos perfis observados na Figura 42, podemos notar que o hidrogel de formulação GXA3 não obteve o perfil desejado, atingindo valores de GI próximos ao do equilíbrio já nas primeiras 2 h de ensaio, sugerindo assim que o fármaco transportado poderia ser liberado no estômago. Já o perfil observado para os demais hidrogéis mostrou que o

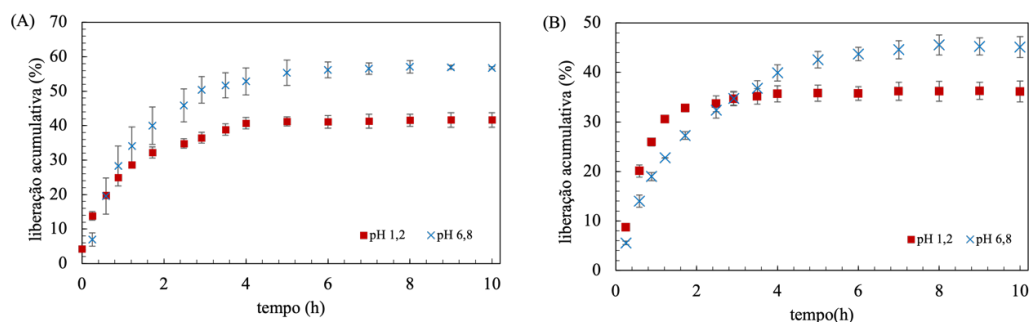
processo de intumescimento permaneceu crescente e atingiu o equilíbrio apenas algumas horas após a alteração do pH para 6,8. Estes resultados demonstraram que os hidrogéis GXA4, GXA5 e GXA6 poderiam ser interessantes e promissores veículos para atuarem como carreadores de VB₁₂ visando sua liberação intestinal.

6.2.4 Liberação de vitamina B₁₂

Baseado nos resultados dos ensaios de intumescimento em soluções de sistema gastrointestinal simulado, os hidrogéis de formulação GXA5 e GXA6 foram selecionados para os ensaios de liberação da vitamina B₁₂, uma vez que ambos apresentaram caráter pH responsivo e diferenças nos mecanismos de intumescimento em pH 1,2 e 6,8, que poderiam influenciar no processo de liberação do fármaco em sistema gastrointestinal simulado. Para ambos os hidrogéis, o mecanismo de difusão Fickiana em solução pH 1,2, bem como o menor GI obtido, poderia resultar em baixa liberação de VB₁₂ no meio gástrico, já a mudança para o mecanismo de transporte anômalo poderia resultar em aumento da liberação do fármaco em pH 6,8, em virtude da contribuição da relaxação das cadeias poliméricas nesta condição, o que permitiria que o fármaco fosse liberado da matriz com maior facilidade.

Para tanto, os hidrogéis uma vez secos e carregados com a VB₁₂ (GXA5 com $4,98 \pm 0,61$ mg de VB₁₂ por g de hidrogel seco e GXA6 com $3,10 \pm 0,97$ mg g⁻¹) foram submetidos aos ensaios de liberação em fluido gástrico (pH 1,2) e fluido intestinal (pH 6,8) simulados, sob temperatura controlada em 37 °C, por 10 horas. As concentrações de VB₁₂ liberadas a cada intervalo de tempo foram determinadas por análises de UV-Vis e calculadas por meio de curva padrão (Figura 28 e Figura 29). O comportamento de liberação do fármaco para os hidrogéis GXA5 e GXA6, em ambos os pHs, é apresentado na Figura 43, após utilização da equação IV.

Figura 43. Liberação acumulativa da vitamina B₁₂ nas soluções tampões de pH 1,2 e 6,8 para os hidrogéis de formulação GXA5 (A) e GXA6 (B).



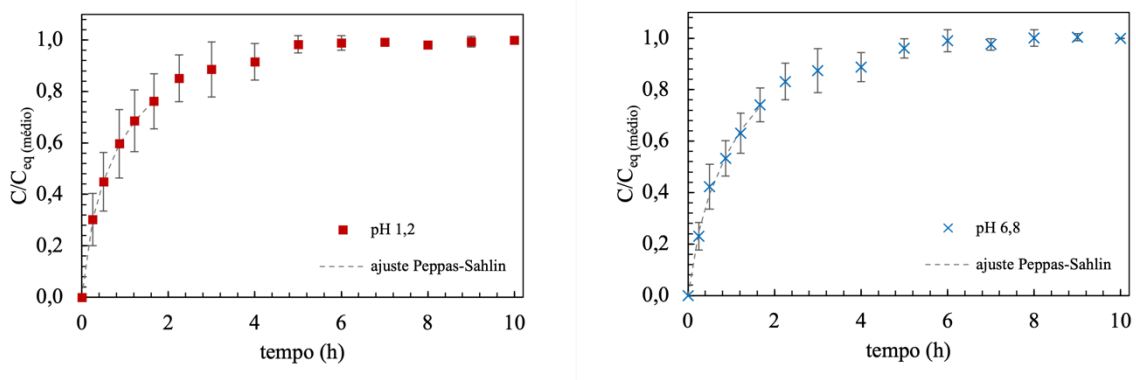
Fonte: a autora.

Para o hidrogel de formulação GXA5 (Figura 40-A), podemos observar que houve uma maior porcentagem de liberação da vitamina em solução de pH 1,2, ao longo de todo o tempo de ensaio, quando comparado com a liberação em pH 6,8. O perfil observado também sugere que a liberação ocorreu de modo mais controlado em pH 6,8, já que menores quantidades do fármaco foram liberadas quando se compara cada intervalo de tempo estudado.

O hidrogel de formulação GXA6, por sua vez, apresenta uma maior porcentagem de liberação acumulativa em solução de pH 6,8, o que definiu diferentes perfis de liberação de VB₁₂ nos diferentes ensaios realizados. Em solução de pH 1,2, o processo de liberação atingiu o equilíbrio mais rapidamente, próximo a 1 hora, enquanto em pH 6,8 o equilíbrio somente foi atingido após 5 horas. Além disso, no pH ácido, observou-se uma menor porcentagem de liberação do fármaco ao longo de todo o ensaio. O perfil de liberação do hidrogel GXA6 o torna mais interessante para aplicação como veículo para liberação controlada de fármacos, já que o pH influencia diretamente na porcentagem de fármaco liberado e no tempo necessário para que se atinja o equilíbrio de liberação.

Para a análise do mecanismo de liberação, as concentrações de VB₁₂ liberadas ao longo do tempo de experimento foram analisadas de acordo com o ajuste de Peppas Sahlin (1989) onde, novamente, consideram-se apenas os valores de concentração (C_t/C_{eq}) até cerca de 60% dos valores observados no equilíbrio (liberação máxima da VB₁₂). Para o hidrogel de formulação GXA5, o perfil de liberação está demonstrado na Figura 44 abaixo.

Figura 44. Perfil da liberação vitamina B₁₂ (C_t/C_{eq}) em fluido gástrico (pH 1,2) e intestinal (pH 6,8) simulado, para os hidrogéis GXA5 ao longo de 10 horas de experimento, a 37 °C.



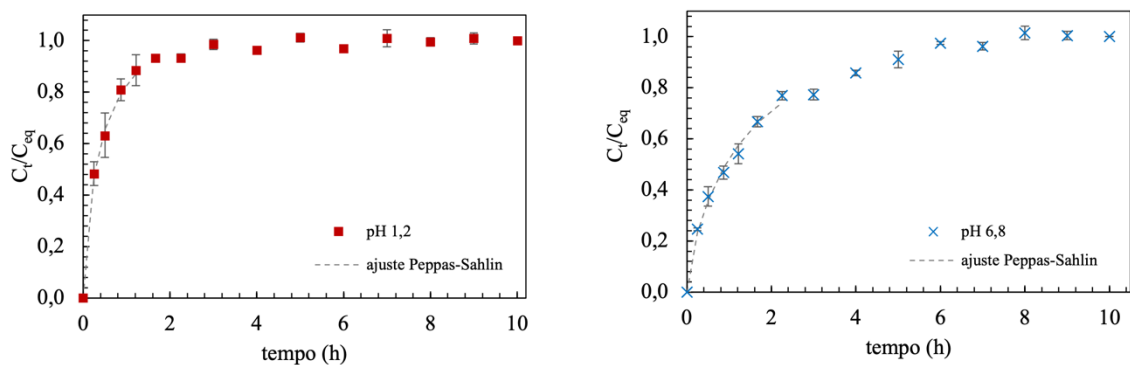
Fonte: a autora.

O perfil de liberação confirma que há uma liberação mais controlada no ensaio realizado em solução tampão de pH 6,8, em que há a liberação de menores porcentagens do fármaco ao

longo do tempo. Em cerca de 15 minutos, por exemplo, no pH estomacal já se observa a liberação de aproximadamente 30% do total de fármaco determinado no equilíbrio. Já no pH 6,8, no mesmo tempo, 20% de liberação da VB₁₂. Para a liberação de 60% da vitamina, em pH 1,2 são necessários 54 minutos, enquanto em pH 6,8 é necessário 1 hora e 15 minutos. A partir deste perfil, é possível então prever a quantidade de fármaco liberado em função do tempo em soluções de pH 1,2 e 6,8 neste hidrogel, como sendo de 5 e 8 h respectivamente.

Para o hidrogel de formulação GXA6, também foi observado um perfil de liberação controlada, apresentado na Figura 45.

Figura 45. Perfil da liberação vitamina B₁₂ (C_t/C_{eq}) em fluido gástrico (pH 1,2) e intestinal (pH 6,8) simulado, para os hidrogéis GXA6 ao longo de 10 horas de experimento, a 37 °C.

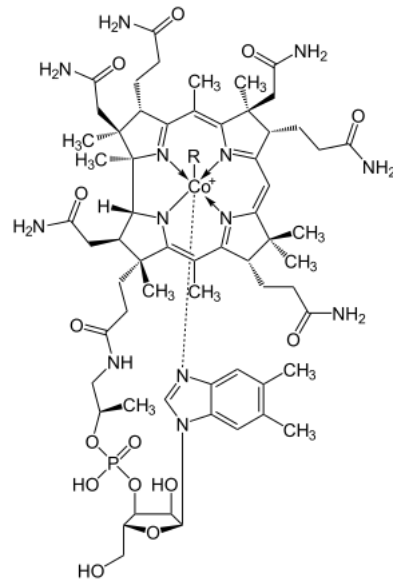


Fonte: a autora.

Neste hidrogel, a VB₁₂ foi liberada rapidamente em meio ácido, atingindo o equilíbrio em aproximadamente 2 h de ensaio. Para a liberação em meio básico, observou-se que o equilíbrio foi atingido aproximadamente em 8 h. Da mesma forma, podemos observar que, nos 15 minutos iniciais, o hidrogel GXA6 liberou, em pH 1,2 cerca de 45% da concentração total liberada no equilíbrio, já em solução pH 6,8, apenas 25% da concentração total foi liberada no mesmo intervalo de tempo. Isto demonstra que a liberação ocorreu mais lentamente, e conseqüentemente, de forma mais controlada no meio em que se simula o pH intestinal.

A vitamina B₁₂, ou cobalamina (representada na Figura 46), possui dois grupamentos ionizáveis com valores de pKa equivalentes a 1,84 e 8,77, em que há a presença do Co⁺ e um grupo OH ligado ao fósforo que podem ser ionizados (National Center for Biotechnology Information, 2022), sendo essencial para o metabolismo, como para a produção de energia, síntese proteica, de hemoglobinas e DNA e na digestão.

Figura 46. Estrutura química da cobalamina.



*R= CN (cianocobalamina); OH (hidroxicobalamina) ou CH₃ (metilcobalamina).

Fonte: adaptado de Paniz et al., 2005.

A VB₁₂ atua como cofator para duas enzimas, a metionina-sintase que está presente no interior das células e é responsável pela metilação da homocisteína, e a L-metilmalonil-CoA mutase (fundamental para a obtenção de energia no ciclo do ácido cítrico) e também para a formação do grupo heme da hemoglobina (DOWD et al., 1975; O'LEARY & SAMMAN, 2010; PANIZ et al., 2005; RAVI et al., 2020). A VB₁₂ é obtida principalmente por alimentação baseada em produtos de origem animal como carnes e derivados. Sua absorção ocorre de maneira complexa no íleo terminal, ou seja, na última porção do intestino delgado, sendo dependente do fator intrínseco, uma glicoproteína (AON et al., 2022). Em termos de suplementação, a dosagem normalmente recomendada é de 1000 µg por via intramuscular ou oral, podendo variar em doses diárias, semanais ou mensais, dependendo da necessidade de cada paciente (Colditz, G. A., 2018). Portanto, se tornaria interessante que a VB₁₂ fosse obtida, via suplementação mediante um sistema de liberação controlada, tendo como alvo o sistema intestinal (pH 6,8), para ser absorvida de acordo com a disponibilidade de fator intrínseco naturalmente presente no organismo.

Considerando os resultados obtidos de liberação acumulativa (Figura 33) e de C_t/C_{eq} (Figura 44 e Figura 45), é possível afirmar que o hidrogel que apresenta maior viabilidade para ser empregado em liberação controlada de VB₁₂ em pH 6,8 é a formulação GXA6, em que uma maior concentração do fármaco é lentamente liberada no pH de interesse.

A partir do ajuste de Peppas-Sahlin (1989), foi possível definir o mecanismo de liberação do fármaco, estando os valores das constantes de difusão (k_d) e relaxação (k_r) apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Valores da constante k_d e k_r no mecanismo de liberação de VB₁₂ encontradas pelo ajuste Peppas-Sahlin.

| Formulação | pH 1,2 | | | pH 6,8 | | | | |
|------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------|
| | Mecanismo de transporte | k_d (h ^{-0.5}) | k_r (h ⁻¹) | R ² | Mecanismo de transporte | k_d (h ^{-0.5}) | k_r (h ⁻¹) | R ² |
| GXA5 | difusão Fickiana | 0,614 | 0 | 0,995 | transporte anômalo | 0,518 | 0,048 | 0,992 |
| GXA6 | difusão Fickiana | 0,805 | 0 | 0,968 | transporte anômalo | 0,497 | 0,010 | 0,998 |

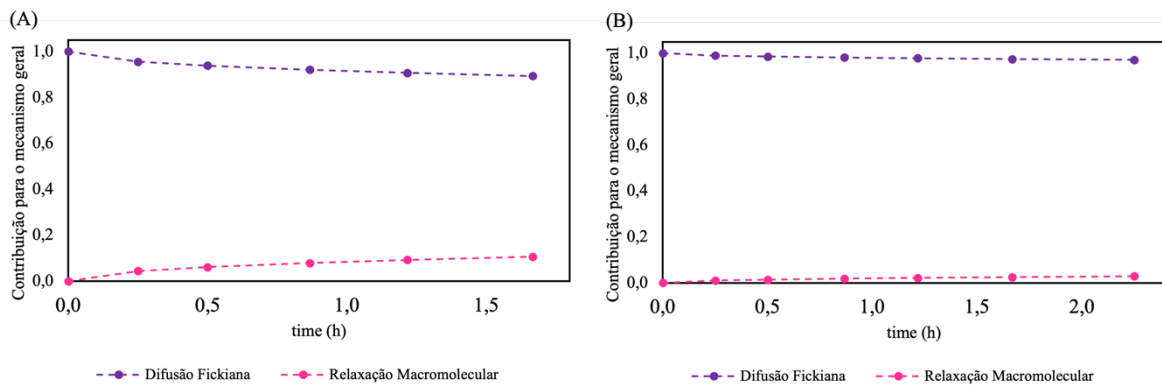
Fonte: a autora.

Pode-se observar, a partir dos valores das constantes k_d e k_r , que a liberação da vitamina em pH 1,2 ocorreu pelo processo de difusão Fickiana em ambos os hidrogéis, já que o mecanismo de relaxação possui ordem zero. Este mecanismo permanece igual ao mecanismo de intumescimento descrito para os ensaios em solução tampão (Tabela 19), indicando que a saída do fármaco da matriz do hidrogel ocorre concomitantemente com o processo de intumescimento, sem a influência da relaxação macromolecular para a liberação da VB₁₂. Quando em pH 1,2, a matriz do hidrogel possui grupamentos -COOH protonados, o que resulta em um hidrogel com carga elétrica neutra. A VB₁₂, como citada anteriormente, possui dois valores de pKa e se encontra neutra nesta condição. Isto corrobora os resultados de mecanismo de liberação encontrados, em que a liberação ocorre por mecanismo de difusão Fickiana.

Em solução de pH 6,8, contudo, podemos observar uma queda significativa nos valores de k_r quando comparados com os valores encontrados para o mecanismo de intumescimento em solução tampão de mesmo pH (Tabela 19). Estes valores são indicativos de que há a diminuição da contribuição do mecanismo de relaxação durante o processo de intumescimento e consequente liberação do fármaco. Estes resultados podem afirmar que há uma interação entre a molécula de VB₁₂ e a matriz do hidrogel, o que dificulta a relaxação das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, retarda a liberação do fármaco. Em pH 6,8, o hidrogel apresenta cargas negativas provenientes dos grupamentos -COO⁻ que se encontram desprotonados, e a VB₁₂ apresenta carga positiva, o que favorece a interação entre o fármaco e a matriz, levando à diminuição da contribuição da relaxação macromolecular em relação aos ensaios de intumescimento e, conseqüentemente, tornando a liberação controlada neste pH.

Os resultados encontrados em relação aos valores de constante de difusão e relaxação permitiram o cálculo da contribuição dos mecanismos presentes no processo de liberação do fármaco, e estão apresentados na Figura 47.

Figura 47. Contribuição da difusão Fickiana e relaxação macromolecular para o mecanismo de liberação de fármaco em ensaios de solução tampão de pH 6,8 para os hidrogéis GXA5 (A) e GXA6 (B).



Fonte: a autora.

No perfil de liberação, podemos observar uma mudança em relação aos perfis de intumescimento apresentados na Figura 41, onde para ambos os hidrogéis houve uma maior contribuição da relaxação macromolecular. Quando há a inserção da vitamina no hidrogel, a interação iônica que se estabelece entre a matriz e o fármaco diminui significativamente a contribuição da relaxação macromolecular, permitindo que o intumescimento ocorra mais lentamente e, conseqüentemente, o fármaco seja liberado de forma mais controlada.

A partir dos resultados encontrados sobre o caráter pH-responsivo de hidrogéis baseados em GX e dos ensaios de liberação em sistema gastrointestinal simulado, podemos concluir que o hidrogel de formulação GXA6 se mostrou um dispositivo com caráter interessante para a liberação de VB₁₂ em solução tampão de pH 6,8. Esta característica gera um produto capaz de suprir a demanda de suplementação da VB₁₂, já que a entrega do fármaco ocorrerá em seu local de maior absorção, o intestino. Para um material que libere diferentes concentrações do fármaco, pode-se realizar testes de absorção com soluções de diferentes concentrações iniciais, podendo alterar a massa obtida em cada hidrogel e, conseqüentemente, a massa da vitamina liberada durante o processo de suplementação. A quantidade de vitamina liberada pode contribuir para a demanda para pacientes com diferentes condições, desde uma suplementação para dietas com deficiência da vitamina até o tratamento de anemia perniciosa ou de sintomas neurológicos causados pela deficiência da VB₁₂.

6.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a formação de hidrogéis químicos, a GX foi modificada quimicamente com GMA, de forma que os hidrogéis sintetizados com uma maior quantidade de espaçador DMA foram mais estáveis, apresentando menor fragilidade em sua manipulação.

A GX apresenta grupos funcionais que podem ser carregados negativamente. Devido a presença destes grupamentos, os hidrogéis sintetizados apresentaram um perfil de intumescimento distinto em soluções tampões de pH 1,2 e 6,8, sendo que apresentaram maiores valores de GI em solução de pH 6,8.

Para a liberação controlada de vitamina B₁₂ em pH intestinal, os hidrogéis de formulação GX6 se mostraram promissores, já que apresentaram um perfil de intumescimento que promove a liberação controlada em solução de pH 6,8. Este perfil apresenta menor GI em solução tampão de pH 1,2 nas primeiras duas horas de ensaio, sendo que, quando transferido para a solução tampão 6,8, o hidrogel permaneceu com o processo de intumescimento, obtendo maior GI ao final do experimento. Quando encapsulados com VB₁₂, estes hidrogéis apresentaram concentração de cerca de 3 µg g⁻¹. Em solução tampão de pH 1,2, liberou uma menor porcentagem do fármaco encapsulado e atingiu o equilíbrio mais rapidamente quando comparado com o ensaio em solução de pH 6,8, em que liberou uma maior porcentagem de fármaco, de forma controlada. Esta formulação liberou 45% do fármaco em pH 6,8 e cerca de 30% em pH 1,2, indicando que o sistema é pH responsivo. Comparando o mecanismo de intumescimento para o hidrogel em solução tampão e o mecanismo da liberação do fármaco, pudemos observar que a vitamina interagiu com a matriz polimérica, retardando a liberação na solução tampão.

6.4 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os hidrogéis baseados em GX se mostraram promissores para a liberação controlada de VB₁₂. O material sintetizado é responsável a mudança de pH, de forma que, em sistema gastrointestinal simulado, o material intumescerá mais em pH 6,8 que em pH 1,2, o que gera materiais passíveis de serem utilizados para a liberação de fármacos em meio intestinal. Para futuras formulações, a partir da formulação GXA6, é possível otimizar a quantidade de vitamina absorvida na matriz polimérica e, posteriormente, liberar maior quantidade do fármaco.

REFERÊNCIAS

- ADROVER, A., PAOLICELLI, P., PETRALITO, S., MUZIO, L. D., TRILLI, J., CESA, S., THO, I., CASADEI, M. A.. Gellan Gum/Laponite Beads for the Modified Release of Drugs: Experimental and Modeling Study of Gastrointestinal Release, **Pharmaceutics**, v. 11, p. 187, 2019.
- AHMAD, S., AHMAD, M., MANZOOR, K., PURWAR, R. IKRAM, S.. A review on latest innovations in natural gums based hydrogels: Preparations & applications, **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 136, p. 870–890, 2019.
- AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, **Journal of Advanced Research**, n. 6, p. 105–121, 2015.
- ARGENTA, D. F., BERNARDO, B. D., CHAMORRO, A. F., MATOS, P. R., CAON, T.. Thermosensitive hydrogels for vaginal delivery of secnidazole as an approach to overcome the systemic side-effects of oral preparations, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 159, 105722, 2021.
- AYCAN, D., ALEMDAR, N.. Development of pH-responsive chitosan-based hydrogel modified with bone ash for controlled release of amoxicillin, **Carbohydrate Polymers**, 184, p. 401–407, 2018.
- BAGHER, Z. EHTERAMI, A., SAFDEL, M. H., KHASTAR, H., SEMIARI, H., ASEFNEJAD, A., DAVACHI, S. M., MIRZAI, M., SALEHI, M.. Wound healing with alginate/chitosan hydrogel containing hesperidin in rat model, **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 55, 101379, 2020.
- BARBUCCI, R., PASQUI, D., FAVAROLO, R., PANARIELLO, G.. A thixotropic hydrogel from chemically cross-linked guar gum: synthesis, characterization and rheological behaviour, **Carbohydrate Research**, 343, 3058-3065, 2008.
- BATISTA, R. A., PEREZ ESPITIA, P. J., SOUZA SIQUEIRA QUINTANS J., FREITAS, M. M., CERQUEIRA, M., TEIXEIRA, J. A., CARDOSO, J. C.. Hydrogel as an alternative structure for food packaging systems, **Carbohydrate Polymers**, 2018.
- BEGUM, S., YUHANA, N. Y., SALEH, N. M., KAMARUDIN, N. H. N., SULONG, A. B., Review of chitosan composite as a heavy metal adsorbent: Material preparation and properties, **Carbohydrate Polymers**, 259, 117613, 2021.
- BHULLAR, N., RANI, S., KUMARI, K., SUD, D.. Amphiphilic chitosan/acrylic acid/thiourea based semi-interpenetrating hydrogel: Solvothermal synthesis and evaluation for controlled release of organophosphate pesticide, triazophos, **Journal of Applied Polymer Science**, 128, 25, 50595, 2021.
- BUENO, V. B., BENTINI, R., CATALANI, L. H., & PETRI, D. F. S.. Synthesis and swelling behavior of xanthan-based hydrogels, **Carbohydrate Polymers**, n. 92, v. 2, p. 1091–1099, 2013.

CHATTERJEE, S., HUI, P. C-I., WAT, E., KAN, C-W, LEUNG, P-C., WANG, W.. Drug delivery system of dual-responsive PF127 hydrogel with polysaccharide-based nano-conjugate for textile-based transdermal therapy, **Carbohydrate Polymers**, 236, 116074, 2020.

CHEN, S. C., WU, Y. C., MI F. L., LIN, Y. H., YU, L. C., SUNG, H. W.. A novel pH-sensitive hydrogel composed of *N,O*-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery, **Journal of Controlled Release**, 96, 285-300, 2004.

CHEN, Y., GAO, Y., SILVA, L. P., PIRRACO, R. P., MA, M., YANG, L., REIS, R. L., CHEN, J.. A thermo-/pH-responsive hydrogel (PNIPAM-PDMA-PAA) with diverse nanostructures and gel behaviours as a general drug carrier for drug release, **Polymer Chemistry**, 29, 9, 4063-4072, 2018.

COLDITZ, G. A., Healthy Diet in Adults Waltham (MA): UpToDate, Inc., 2022. Acesso em 12/04/2022 <<https://www.uptodate.com/contents/healthy-diet-in-adults>>.

COLOMBO, P.. Swelling-controlled release in hydrogel matrices for oral route, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 11, p. 37-57, 1993.

DERAKHSHANKAH, H., HAGHSHENAS, B., ESKANDANI, M., JAHANBAN-ESFAHLAN, R., ABBASI-MALEKIM S., JAYMAND, M.. Folate-conjugated thermal and pH-responsive magnetic hydrogel as a drug delivery nano-system for “smart” chemo/hyperthermia therapy of solid tumors, **Materials Today Communications**, 30, 103148, 2022.

DOWD, P., SHAPIRO, M., KANG, K., 1975. The mechanism of action of vitamin B12, **Journal of the American Chemistry Society**, 97, 4754–4757.

ELELLA, M. H. A., GODA, E. S., ALLAH-GAB, M. A., HONG, S. E., PANDIT, B., LEE, S., GAMAL, H., REHMAN, A., YOON, K. R.. Xanthan gum-derived materials for applications in environment and eco-friendly materials: A review, **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 9, 104702, 2021.

EL-ZAWAHRY, M. M., HASSABO, A. G., ABDELGHAFAR, F., ABDELGHAFAR, R. A., HAKEIN, O. A.. Preparation and Use of Aqueous Solutions Magnetic Chitosan/Nanocellulose Aerogels for the Sorption of Reactive Black 5, **Biointerface Research in Applied Chemistry**, 11, 4, p. 12380-12402, 2021.

FAN L., GE, X., QIAN, Y., WEI, M., ZHANG, Z., YUAN, W., OUYANG, Y.. Advances in Synthesis and Applications of Self-Healing Hydrogels. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. 654, 2019.

GARNER, J., PARK, K.. Chemically Modified Natural Polysaccharides to Form Gels, **Polysaccharides**, p. 1555–1582, 2015.

GETACHEW, B. A. KIM, S. R., KIM, J. H.. Improved stability of self-healing hydrogel pore-filled membranes with ionic cross-links, **Journal of Membrane Science**, 553, 1-9, 2018.

GHAURI, H. Z., ISLAM, A., QADIR, M. A., GHAFAR, A., GULL, N., AZAM, M., MEHMOOD, A., GHAURI, A. A., KHAN, U. R.. Novel pH-responsive chitosan/sodium alginate/PEG based hydrogels for release of sodium ceftriaxone, **Materials Chemistry and Physics**, 277, p. 125456, 2022.

GHORBANLOO, M., HEIDARY, A.. pH Sensitive Hydrogel Based Acrylic Acid for Controlled Drug Release, **Physical Chemistry Research**, 5, 1, 185-193, 2017.

GONG, Z., NIU, F., ZHANG, G., LI, J., LI, G., HUANG, W., DENG, H., SUN, R., WONG, C.. Effects of composition on the properties of dual physically cross-linked hydrogel composed of polyvinyl alcohol and poly (acrylamide-co-acrylic acid), **Journal of Polymer Research**, 24, 127, 2017.

GUCCHAIT, S., ROY, A., DAS, S., KHAN, M., PRADHAN, A., CHOUDHURY, S. M., ROY, S.. Tripeptide based nontoxic hydrogelators as carrier of vitamin B₁₂ and doxorubicin, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 618, 126483, 2021.

GUMOS, T., DEMIRCI, A. S., MIRIK, M., ARICI, M., AYSAN, Y., Xanthan Gum Production of *Xanthomonas* spp. Isolated from Different Plants, **Food Science Biotechnology**, 19, 1, p. 201-206, 2010.

GUO, T., WANGXIA, W., SONG, J., JIN, Y., XIAO, H. Dual-responsive carboxymethyl cellulose/dopamine/cystamine hydrogels driven by dynamic metal-ligand and redox linkages for controllable release of agrochemical, **Carbohydrate Polymers**, 253, 117188, 2021.

HAIKHANI, M., KHANGHAHI, M.M., SHAHROUSVAND, M., MOHAMMADI-ROVSHANDEH, J., BABAEI, A., KHADEMI, S. M. H.. Intelligent superabsorbents based on a xanthan gum/poly (acrylic acid) semi-interpenetrating polymer network for application in drug delivery systems, **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 139, p. 509–520, 2019

HANNA, D. H., LOTFY, V. F., BASTA, A. H., SAAD, G. R.. Comparative evaluation for controlling release of niacin from protein- and cellulose-chitosan based hydrogels, **International Journal of Biological Macromolecules**, 150, p. 228–237, 2020.

HANNA, D. H., SAAD, G. R.. Encapsulation of ciprofloxacin within modified xanthan gum-chitosan based hydrogel for drug delivery, **Bioorganic Chemistry**, n. 84, p. 115–124, 2019.

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

HUANG, M., WANG, Y., AHMAD, M., YING, R., WANG, Y., TAN, C.. Fabrication of pickering high internal phase emulsions stabilized by pecan protein/xanthan gum for enhanced stability and bioaccessibility of quercetin, **Food Chemistry**, 357, 129732, 2021.

HUANG, X., BRAZEL, C. S.. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems, **Journal of Controlled Release**, 73, 121-136, 2001.

JIANG, Y., WANG, Y., LI, Q., YU, C., CHU, W.. Natural Polymer-based Stimuli-responsive Hydrogels, **Current Medicinal Chemistry**, 27, p. 2631-2657, 2020.

JOSEPH, S. M., KRISHNAMOORTHY, S., PARANTHAMAN, R., MOSES, J. A., ANANDHARAMAKRISHNAN, C.. A review on source-specific chemistry, functionality, and applications of chitin and chitosan, **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, 2, 100036, 2021.

KAUSHIK, P., PRIYADARSHINI, E., RAWAT, K., RAJAMANI, P., BOHIDAR, H. B.. pH responsive doxorubicin loaded zein nanoparticle crosslinked pectin hydrogel as effective site-specific anticancer substrates, **International Journal of Biological Macromolecules**, 152, p. 1027-1037, 2020.

KHORASANI, A.C., KOUHFAR, F. SHOJAOSADARI, S. A.. Pectin/lignocellulose nanofibers/chitin nanofibers bionanocomposite as an efficient biosorbent of cholesterol and bile salts, **Carbohydrate Polymers**, 261, 117883, 2021.

KIM, D. W., SHCHIPUNOV, Y., KIM, G. H., SHIN, I., HA, C. S.. Effect of graphene oxide content on the tensile properties and swelling ratio of chitosan/xanthan gum/graphene oxide hydrogel films, **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, 706, 1, 72-78, 2020.

KIM, H. M., PARK, W. H.. Chemically cross-linked silk fibroin hydrogel with enhanced elastic properties, biodegradability, and biocompatibility, **International Journal of Nanomedicine**, 11, 2967-2978, 2016.

KOWALCZYK, P., PODGORSKI, R., WOJASINSKI, M., GUT, G., BOJAR, W., CIACH, T.. Chitosan-Human Bone Composite Granulates for Guided Bone Regeneration, **International Journal of Molecular Sciences**, 22, 5, 2324, 2021.

KRITCHENKOV, A. S., KLETSKOV, A. V., EGOROV, A. R., TSKHOVREBOV, A.G., KURLIUK, A. V., ZHALIAZNIAK, N. V., SHAKOLA, T. V., KHRUSTALEV, V. N.. New water-soluble chitin derivative with high antibacterial properties for potential application in active food coatings, **Food Chemistry**, 343, 128698, 2021.

KURAPINA, N., RATANOV, M., NIKOLSKAYA, O., KIKTEVA, Y.. Increasing the output of grape seedlings using biostimulants of natural origin, **BIO Web of Conferences**, 25, 05009, 2020.

LEE, J., H., YEO, Y.. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers, **Chemical Engineering Science**, 125, 75-84, 2015.

LEE, P. I.. Kinetics of Drug Release from Hydrogel Matrices, **Journal of Controlled Release**, 2, p. 277-288, 1985.

LEGANÉS, J., RODRÍGUEZ, A. M., ARRANZ, M. A., CASTILLO-SARMIENTO, C. A., BALLESTEROS-YÁÑEZ, I., MIGALLÓN, A. S., MERINO, S., VÁZQUEZ, E.. Magnetically

responsive hydrophobic pockets for on-off drug release, **Materials Today Chemistry**, 23, P. 100702, 2022.

LEI, H., FAN, D.. Conductive, adaptive, multifunctional hydrogel combined with electrical stimulation for deep wound repair, **Chemical Engineering Journal**, 421, 129578, 2021.

LI, B., ZHANG, L., WANG, D., LIU, W., LI, H., LIANG, C., ZHAO, X.. Thermo-sensitive hydrogel on anodized titanium surface to regulate immune response, **Surface & Coatings Technology**, 405, 126624, 2021.

LI, C., WANG, J., WANG, Y., GAO, H., WEI, G., HUANG, Y., YU, H., GAN, Y., WANG, Y., MEI, L., CHEN, H., HU, H. ZHANG, Z., JIN, I.. Recent progress in drug delivery, **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 9, 6, 1145-1162, 2019.

LI, X., WANG, J., LIN, Y., CHENG, Y., HAN, W., YUAN, G., JIA, H.. High-strength, biocompatible and multifunctional hydrogel sensor based on dual physically cross-linked network, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 635, 128091, 2022.

LIU, S., ODERINDE, O., HUSSAIN, I., YAO, F., FU, G.. Dual ionic cross-linked double network hydrogel with self-healing, conductive and force sensitive properties, **Polymer**, 144, 111-120, 2018.

LIU, X., HE, X., YANG, B., LAI, L., CHEN, N., HU, J., LU, Q.. Dual Physically Cross-Linked Hydrogels Incorporating Hydrophobic Interactions with Promising Repairability and Ultrahigh Elongation **Advanced Functional Materials**, 31, 3, 2008187, 2020.

LIMA, D. S., TENÓRIO-NETO, E. T., LIMA-TENÓRIO, M. K., GUILHERME, M.R., SCARIOT, D. D., NAKAMURA, C. V., MUNIZ, E. C., RUBIRA, A. F.. pH-responsive alginate-based hydrogels for protein delivery, **Journal of Molecular Liquids**, 262, p. 29-36, 2018.

LIMA-TENÓRIO, M. K., TENÓRIO-NETO, E. T., GUILHERME, M. R., GARCIA, F. P., NAKAMURA, C. V., PINEDA, E. A. G., RUBIRA, A. F.. Water transport properties through starch-based hydrogel nanocomposites responding to both pH and a remote magnetic field, **Chemical Engineering Journal**, 259, p. 620–629, 2015.

LUNGAN, M.A., POPA, M., DESBRIERES, J., RACOVITA, S., VASILIU, S.. Complex microparticulate systems based on glycidyl methacrylate and xanthan, **Carbohydrate Polymers**, 104, 213-222, 2014.

LUO, L. J., NGUYEN, D. D., HUANG, C.. Therapeutic hydrogel sheets programmed with multiusage drug delivery for effective treatment of corneal abrasion, **Chemical Engineering Journal**, 429, p. 132409, 2022.

MA, M. S., ZHONG, Y. L., JIANG, X.. Thermosensitive and pH-responsive tannin-containing hydroxypropyl chitin hydrogel with long-lasting antibacterial activity for wound healing, **Carbohydrate Polymers**, 236, 116096, 2020.

MA, X., YANG, Z., WANG, Y., ZHANG, G., SHAO, Y., JIA, H., CAO, T., WANG, R., LIU, D.. Remote Controlling DNA Hydrogel by Magnetic Field, **ACS Applied Materials & Interfaces**, 9, p. 1995-2000, 2017.

MALUIN, F. N., HUSSEIN, M. Z.. Chitosan-Based Agronanochemicals as a Sustainable Alternative in Crop Protection, **Molecules**, 25, 7, 1611, 2020.

MATYJASZEWSKI, K. MÖLLER, M.. **Polymer Science: A Comprehensive Reference**, CSIRO Materials Science and Engineering, Clayton, VIC, Australia, vol 3, 2012.

MEENACH, S. A., HILT, J. Z., ANDERSON, K. W.. Poly(ethylene glycol)-based magnetic hydrogel nanocomposites for hyperthermia cancer therapy, **Acta Biomaterialia**, 6, p. 1039-1046, 2010.

MEHRA, S., NISAR, S., CHAUHAN, S., SINGH, G., SINGH, V., RATTAN, S., A dual stimuli responsive natural polymer based superabsorbent hydrogel engineered through a novel cross-linker. **Polymer chemistry**, v. 12, p. 2404 - 2420, 2021.

MOHAMMADINEJAD, R., KUMAR, A., RANJBAR-MOHAMMADI, M., ASHRAFIZADEH, M., HAN, S. S., KHANG, G., ROVEIMIA, Z.. Recent Advances in Natural Gum-Based Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review, **Polymers**, v.12, n. 176, 2020.

MURI, E. M. F.. **Química orgânica: aplicações farmacêuticas**, 1 ed. Curitiba: Appris, 2019.

NASROLLAHPOUR, H., ISILDAK, I., RASHIDI, MR., HASHEMI, E. A., NASERI, A., KHALILZADEH, B.. Ultrasensitive bioassaying of HER-2 protein for diagnosis of breast cancer using reduced graphene oxide/chitosan as nanobiocompatible platform, **Cancer Nanotechnology**, 12, 1, 10, 2021.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 5311498, Cyanocobalamin. Acesso em 20 de abril de 2022 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyanocobalamin>.

NATH, J., DOLUI, S. K.. Synthesis of carboxymethyl cellulose-g-poly(acrylic acid)/LDH hydrogel for in vitro controlled release of vitamin B₁₂, **Applied Clay Science**, n. 155, p. 65–73, 2018.

NGUYEN, M. K., & ALSBERG, E.. Bioactive factor delivery strategies from engineered polymer hydrogels for therapeutic medicine, **Progress in Polymer Science**, n. 39, v. 7, p. 1235–1265, 2014.

NGWABEBHOH, F. A., ZANDRAA, O., PATWA, R., SAHA, N., CAPÁKOVÁ, Z., SAHA, P.. Self-crosslinked chitosan/dialdehyde xanthan gum blended hypromellose hydrogel for the controlled delivery of ampicillin, minocycline and rifampicin, **International Journal of Biological Macromolecules**, 167, 1468-1478, 2021.

- O'LEARY, F., SAMMAN, S., 2010. Vitamin B12 in Health and Disease. **Nutrients**, 2, 299-316.
- PAHRI, R.. Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review, **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, n. 7, v. 4, p. 515-530, 2017.
- PANIZ, C., GROTO, D., SCHMITT, G. C., VALENTINI, J., SCHOTT, K. L., POMBLUM, V. J., GARCIA, S. C.. Physiopathology of vitamin B12 deficiency and its laboratorial diagnosis, **Jornal Brasileiro da Patologia Médica Laboratorial**, v. 41, n. 5, p.323, 334, 2005.
- PATEL, J., MAJI, B., MOORTHY, N. S. H. N., MAITI, S.. Xanthan gum derivatives: review of synthesis, properties and diverse applications, **The Royal Society of Chemistry**, 10, p. 27103-27136, 2020.
- PAULA, R. C. M., PAULA, H. C. B., FEITOSA, J. P. A.. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira, Imprensa Universitária UFC, Fortaleza, 2018, p. 293-333.
- PAWLICKA, A., TAVARES, F. C., DÖRR, D. S., CHOLANT, C. M., ELY, F., SANTOS, M. J. L., AVELLANEDA, C. O.. Dielectric behavior and FTIR studies of xanthan gum-based solid polymer electrolytes, **Electrochimica Acta**, 305, 232-239, 2019.
- PELLÁ, M. C. G., LIMA-TENÓRIO, M. K., TENÓRIO-NETO, E. T., GUILHERME, M. R., MUNIZ, E. C., RUBIRA, A. F., Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications, **Carbohydrate Polymers**, n. 196, p. 233–245, 2018.
- PELLÁ, M. C. G., SIMÃO, A. R., LIMA-TENÓRIO, M. K., TENÓRIO-NETO, E., SCARIOT, D. B., NAKAMURA, C. V., RUBIRA, A. F.. Chitosan hybrid microgels for oral drug delivery, **Carbohydrate Polymers**, 239, 116236, 2020.
- PENG, H., LV, Y., WEI, G., ZHOU, J., GAO, X., SUN, K., MA, G., LEI, Z.. A flexible and self-healing hydrogel electrolyte for smart supercapacitor, **Journal of Power Sources**, 431, p. 210-219, 2019.
- PEPPAS, N. A., COLOMBO, P.. Analysis of drug release behavior from swellable polymer carriers using the dimensionality index, **Journal of Controlled Release**, 45, p. 35-40, 1997.
- PEPPAS, N. A., SAHLIN, J. J., A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation, **International Journal of Pharmaceutics**, 5,7, 69-172, 1989.
- PINELLI, F., MAGAGNIN, L., ROSSI, F.. Progress in hydrogels for sensing applications: a review, **Materials Today Chemistry**, n. 17, p. 100317, 2020.
- POTAFEUX, J.E.M ODENT, J., CUVIER, D. N., LAURO, F., RAQUEZ, J. M.. A Comprehensive Review about the Structure-Properties of Ionic Polymeric Materials, **RSC Polymer Chemistry**, 00, 1-3, 2020.

- PREETHA, B. K., VISHALAKSHI, B.. Karaya gum-graft-poly(*N,N'*-dimethylacrylamide) gel: A pH responsive potential adsorbent for sequestration of cationic dyes, **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 8, 2, 103608, 2020.
- RATHER, S. A., MASOODI, F. A., RATHER, J. A., AKHTER, R., GANI, A., GANAIE, T. A.. Effects of xanthan gum, canning and storage period on fatty acid profile and cholesterol oxidation of restructured low-fat meat product of India, **Food Chemistry**, 359, 128450, 2021.
- RAVI, P. V., THANGADURAI, T. D., NATARAJ, D., 2020. Ultra-sensitive detection of commercial vitamin B9 and B12 by graphene nanobuds through inner filter effect. **Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry**, 400, 112691.
- REIS, A. V., FAJARDO, A. R., SCHUQUEL, I. T. A., GUILHERME, M. R., VIDOTTI, G. J., RUBIRA, A. F., MUNIZ, E. C.. Reaction of Glycidyl Methacrylate at the Hydroxyl and Carboxylic Groups of Poly(vinyl alcohol) and Poly(acrylic acid): Is This Reaction Mechanism Still Unclear? **Journal of Organic Chemistry**, 74, 10, 3750-3757, 2009.
- SANO, N. C., SALAZAR, G. M., PENALOZA, D. P.. Magnetic Biopolymeric Hydrogel Composite Material with Self-healing Attribute, **Biointerface Research in Applied Chemistry**, 11, 6, p. 14881-14888, 2021.
- SARA, H., YAHOU, M. M., LEFNAOUI, S., ABDELKADER, H., MOULAI-MOSTEFA, N.. New alkylated xanthan gum as amphiphilic derivatives: Synthesis, physicochemical and rheological studies, **Journal of Molecular Structure**, 1207, 127768, 2020.
- SARTI, F., MÜLLER, C., IQBAL, J., PERERA, G., LAFFLEUR, F., BERNKOP-SCHNÜRCH, A.. Development and in vivo evaluation of an oral vitamin B12 delivery system, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 84, p. 132–137, 2013.
- SHALVIRIM A., LIU, Q., ABDEKHODAIE, M. J., WU, Y. X.. Novel modified starch-xanthan gum hydrogels for controlled drug delivery: Synthesis and characterization, **Carbohydrate Polymers**, 79, 898-907, 2010.
- SHAO, H., GUO, J., LI, Y., YU, J., QIN, S., Reactive Grafting of Glycidyl Methacrylate onto Poly(ethylene-1-octene), **Advanced Materials Research**, 239-242, 2011.
- SHARMA, G., THAKUR, B., NAUSHAD, M., KUMAR, A., STADLER, F. J., ALFADUL, S. M., MOLA, G. T.. Applications of nanocomposite hydrogels for biomedical engineering and environmental protection, **Environmental Chemistry Letters**, v. 16, p. 113-146, 2018.
- SIGH, R., UPADHYAY, S. K., SINGH, M., SHARMA, I., SHARMA, P., KAMBOJ, P., SAINI, A., VORAHA, R., SHARMA, A. K., UPADHYAY, T. K., KHAN, F.. Chitin, Chitinases and Chitin Derivatives in Biopharmaceutica; Agricultural and Environmental Perspective, **Biointerface Research in Applied Chemistry**, 11, 3, p. 9985-10005, 2021.
- SUN, Y., YU, Y., ZHENG, X., CHEN, A., ZHENG, H.. Magnetic flocculation of Cu(II) wastewater by chitosan-based magnetic composite flocculants with recyclable properties, **Carbohydrate Polymers**, 261, 117891, 2021.

TAN, L. I., LI, J., LIU, Y., ZHOU, H., ZHANG, Z., DENG, L.. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin-conjugated alginate hydrogel for controlled release of hydrocortisone acetate in response to mechanical stimulation, **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, 30 (6), 584-599, 2015.

TANG, L., WANG, L., YANG, X., FENG, Y., LI, Y., FENG, W.. Poly(*N*-isopropylacrylamide)-based smart hydrogels: Design, properties and applications, **Progress in Materials Science**, n. 115, 2021.

TANG, S., CHI, K., XU, H., YONG, Q., YANG, J., CATCHMARK, J. M.. A covalently cross-linked hyaluronic acid/bacterial cellulose composite hydrogel for potential biological applications, **Carbohydrate Polymers**, 252, 117123, 2021.

THEODORAKIS, N., SARAVANOU, S. F., ZOULI, N. P., IATRIDI, Z., TSITSILIANIS, C.. pH/Thermo-Responsive Grafted Alginate-Based SiO_2 Hybrid Nanocarrier/Hydrogel Drug Delivery Systems, **Polymers**, 13, 1228, 2021.

TÜRKYILMAZ, M., HAMZAOGLU, F., ÖZKAN, M.. Effects of pasteurization and storage on turbidity and copigmentation in pomegranate juices clarified with various hydrocolloid combinations, **Food Chemistry**, 358, 129803, 2021.

VILSINSKI, B. H., SOUZA, P. R., OLIVEIRA, A. C., CÉSAR, M. C., VALENTE, A. J. M., MUNIZ, E. C., BORGES, O., GEROLA, A. P., CAETANO, W., MARTINS, A. F.. Photophysics and drug delivery behavior of methylene blue into Arabic-gum based hydrogel matrices, **Materials Today Communications**, 26, 101889, 2021.

WANG, S., SHAO, G., YANG, J., LIU, J., WANG, J., ZHAO, H., YANG, L., LIU, H. ZHU, D., LI, Y., JIANG, L.. The production of gel beads of soybean hull polysaccharides loaded with soy isoflavone and their pH-dependent release, **Food Chemistry**, 313, 126095, 2020.

WELLS, C. M., HARRIS, M., CHOI, L., MURALI, V. P., GUERRA, F. D., JENNINGS, J. A.. Stimuli-Responsive Drug Release from Smart Polymers, **Journal of Functional Biomaterials**, v. 20, p. 34, 2019.

YONEZAWA, Uilian Gabaldi. **Síntese, caracterização e aplicação de hidrogéis nanoestruturados contendo nanoargila para melhorar a germinação e qualidade de muda de hortaliça**. Orientador: Prof. Dr. Fauze Ahmad Aouada. 2016. 87 f. Dissertação (Mestrado) – Ciência dos Materiais, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2016.

YOUNES, I., RINAUDO, M.. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications, **Marine Drugs**, 13, p. 1133-1174, 2015.

YUE, S., HE, H. LI, B., HOU, T.. Hydrogel as a Biomaterial for Bone Tissue Engineering: A Review, **Nanomaterials**, n. 10, 1511, 2020.

ZARGAR, V., ASGHARI, M., DASHTI, A.. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications, **ChemBioEngRev**, 2, n.3, p. 204-226, 2015.

ZHANG, C., DAI, Y., WU, Y., LU, G., CAO, Z., CHENG, J., WANG, K., YANG, H., XIA, Y., WEN, X., MA, W., LIU, C., WHANG, Z.. Facile preparation of polyacrylamide/chitosan/Fe₃O₄ composite hydrogels for effective removal of methylene blue from aqueous solution, **Carbohydrate Polymers**, 234, 115882, 2020.

ZHANG, C., LIM, S.. Physical modification of various starches by partial gelatinization and freeze-thawing with xanthan gum, **Food Hydrocolloids**, n. 111, 2021.

ZHENG, M., LIAN, F., XIONG, Y., LIU, B., ZHU, Y., MIAO, S., ZHANG, L., ZHENG, B.. The synthesis and characterization of a xanthan gum-acrylamide-trimethylolpropane triglycidyl ether hydrogel, **Food Chemistry**, 272, p. 574-579, 2019.

ZHENG, Z., BIAN, S., LI, Z., ZHANG, Z., LIU, Y., ZHAI, X., PAN, H., ZHAO, X.. Catechol modified quaternized chitosan enhanced wet adhesive and antibacterial properties of injectable thermo-sensitive hydrogel for wound healing, **Carbohydrate Polymers**, 249, 116826, 2020.

ZHU, M., LU, D., MILANI, A. H., MAHMOUDI, N., KING, S. M., SAUNDERS, B. R.. Comparing pH-responsive nanogel swelling in dispersion and inside a polyacrylamide gel using photoluminescence spectroscopy and small-angle neutron scattering, **Journal of Colloid and Interface Science**, 608, 378-385, 2022.

**ANEXO A - RESULTADOS OBTIDOS PARA O TESTE T DE STUDENT PARA
HIDROGÉIS BASEADOS EM GX**

Ensaio de intumescimento em água destilada - Hidrogéis baseados em GXA

$n = 3, \alpha = 0,05$

| Formulações analisadas | Stat t | p-value | t crítico |
|------------------------|--------------|-------------|-------------|
| GXA1 e GXA2 | 1,793313276 | 0,073690477 | 2,131846786 |
| GXA1 e GXA3 | -4,879158504 | 0,004082781 | 2,131846786 |
| GXA2 e GXA3 | -5,741124338 | 0,00524733 | 2,353363435 |
| GXA3 e GXA4 | 15,98948412 | 0,001944295 | 2,91998558 |
| GXA3 e GXA5 | 7,737172002 | 0,008148668 | 2,91998558 |
| GXA3 e GXA6 | 10,80044016 | 0,000848933 | 2,353363435 |
| GXA4 e GXA5 | -33,68632284 | 0,000440037 | 2,91998558 |
| GXA4 e GXA6 | -7,829939506 | 0,007961284 | 2,353363435 |
| GXA5 e GXA6 | 4,193836135 | 0,006881961 | 2,131846786 |

Ensaio de intumescimento em água destilada - Hidrogéis baseados em GXB

$n = 3, \alpha = 0,05$

| Formulações analisadas | Stat t | p-value | t crítico |
|------------------------|--------------|-------------|-------------|
| GXB1 e GXB2 | -4,517256413 | 0,010140307 | 2,353363435 |
| GXB1 e GXB3 | -2,43215354 | 0,046575282 | 2,353363435 |
| GXB2 e GXB3 | 4,193836135 | 0,006881961 | 2,131846786 |

Ensaio de intumescimento em tampão - Hidrogéis baseados em GXA

$n = 3, \alpha = 0,05$

| Formulações analisadas | Stat t | p-value | t crítico |
|------------------------|------------|------------|-------------|
| GXA3 | -3,3428899 | 0,09252307 | 6,313751515 |
| GXA4 | 0,18070176 | 0,44309492 | 6,313751515 |
| GXA5 | 6,79350781 | 0,04652093 | 6,313751515 |
| GXA6 | -19,518781 | 0,01629363 | 6,313751515 |

**ANEXO B - RESULTADOS OBTIDOS PARA O TESTE T DE STUDENT PARA
HIDROGÉIS BASEADOS EM QTS**

| Ensaio de intumescimento em água destilada - Hidrogéis baseados em QTSA | | | |
|---|--------------|-------------|-------------|
| n = 3, $\alpha = 0,05$ | | | |
| Formulações analisadas | Stat t | p-value | t crítico |
| QTSA1 e QTSA2 | 1,229657894 | 0,153233573 | 2,353363435 |
| QTSA1 e QTSA3 | 1,779370077 | 0,108571494 | 2,91998558 |
| QTSA2 e QTSA3 | 0,706042056 | 0,276662681 | 2,91998558 |
| QTSA3 e QTSA4 | 16,71341553 | 3,75462E-05 | 16,71341553 |
| QTSA3 e QTSA5 | 12,32568045 | 0,000124468 | 2,131846786 |
| QTSA4 e QTSA5 | -0,043326186 | 0,484081987 | 2,353363435 |

| Ensaio de intumescimento em água destilada - Hidrogéis baseados em QTSB | | | |
|---|--------------|------------|-------------|
| n = 3, $\alpha = 0,05$ | | | |
| Formulações analisadas | Stat t | p-value | t crítico |
| QTSB2 e QTSB3 | -6,853969603 | 0,00118605 | 2,131846786 |

| Ensaio de intumescimento em tampão - Hidrogéis baseados em QTSA | | | |
|---|-------------|-------------|-------------|
| n = 3, $\alpha = 0,05$ | | | |
| Formulações analisadas | Stat t | p-value | t crítico |
| QTSA4 | 7,527308395 | 0,04204117 | 6,313751515 |
| QTSA5 | 1,332680524 | 0,204907595 | 6,313751515 |

**ANEXO C - RESULTADOS OBTIDOS PARA O TESTE T DE STUDENT PARA
LIBERAÇÃO DE VB12 EM HIDROGÉIS GXA5 E GXA6**

| Ensaio de liberação de VB ₁₂ - Hidrogéis baseados em GX | | | |
|--|------------|------------|------------|
| n = 3, $\alpha = 0,05$ | | | |
| Formulações analisadas | Stat t | p-value | t crítico |
| GXA5 | -4,4345132 | 0,07059922 | 6,31375151 |
| GXA6 | -3,7708803 | 0,01632306 | 2,35336343 |