

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

BRUNA FERNANDES ANTUNES

RETICULAÇÃO DO AMIDO POR REAÇÃO DE DIELS-ALDER

Araraquara, SP

2021

BRUNA FERNANDES ANTUNES

RETICULAÇÃO DO AMIDO POR REAÇÃO DE DIELS-ALDER

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientadora: Eliane Trovatti

Araraquara, SP

2021

A642r Antunes, Bruna Fernandes

Reticulação do amido por reação de Diels-Alder/Bruna Fernandes
Antunes. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2021.
70f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
em Medicina Regenerativa e Química Medicinal- Universidade de
Araraquara-UNIARA

Orientador: Profa. Dra. Eliane Trovatti

1. Amido modificado. 2. Click chemistry. 3. Biopolímero. 4. Biomaterial.
5. Derivados furânicos. 6. Bismaleimida. I. Título.

CDU 57.089

BRUNA FERNANDES ANTUNES

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 22 de janeiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. ELIANE TROVATTI (Orientadora)
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. ANDRÉ CAPALDO AMARAL
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. LÍSIAS PEREIRA NOVO
Universidade Federal do Oeste da Bahia - UFOB

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Medicina regenerativa e Química Medicinal – UNIARA, pela oportunidade da realização do Mestrado e contribuição com minha formação.

À Prof.^a Dra. Eliane Trovatti, pela oportunidade, pela orientação, apoio e por todos os ensinamentos transmitidos, compartilhando sua experiência e contribuindo muito com meu crescimento científico e profissional.

Aos Prof. Dr. Alessandro Gandini e Prof. Dr. Antônio José Felix de Carvalho, por toda contribuição durante o trabalho. E ao Dr. Ricardo Klaus Kramer, por ter cedido material (bismaleimida) para utilização no experimento prático.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) pela concessão da bolsa e apoio financeiro para a realização desta pesquisa (Processo: 2019/21189-0).

À equipe do Laboratório de Química Inorgânica Medicinal (QIM), Prof. Dr. Antônio Massabni, Dr. Mauricio Cavichioli e José Alberto por todo apoio e contribuição cedendo espaço no laboratório para realização dos experimentos.

A equipe do Laboratório LECER, Prof.^a Ma. Renata de Aquino Carvalho e Prof. Dr. André Capaldo Amaral, pela contribuição e parceria com a realização dos experimentos práticos de viabilidade celular.

Aos amigos ao longo do curso pela amizade e companheirismo: Paula, Daniela, Cibele, Pietra, Fábio e José.

Aos professores: André, Nivaldo, Rogério e Jorge, por todo ensinamento, ideias e contribuição com minha formação. Às secretárias, Sandra e Laura, pela ajuda nas dúvidas e documentações.

Aos membros da banca, Dr. André Capaldo Amaral e Dr. Lísias Pereira Novo, por aceitarem o convite e, assim, contribuírem com a melhoria deste trabalho. E a Prof.^a Dra. Talita Martins Lacerda, banca na qualificação, pela contribuição com os apontamentos e sugestões realizadas para melhorias do trabalho final.

Aos meus pais, Sônia e Sérgio, por sempre me apoiarem nos estudos e não medirem esforços para meu crescimento e melhoria.

Ao Kelvin, pelo amor, companheirismo e compreensão de sempre nas minhas decisões.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

RESUMO

A busca por novos materiais derivados de biopolímeros tem recebido cada vez mais atenção devido à sua potencial aplicabilidade em diversos setores, incluindo a área biomédica. Apesar das muitas vantagens, os biopolímeros ainda encontram pouca aplicação na área biomédica devido, dentre outras, às limitadas propriedades mecânicas e à rápida biodegradabilidade em condições fisiológicas, como o caso do amido, por exemplo. O amido é um polímero de fonte natural renovável, de alta disponibilidade, alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, solubilidade em meio aquoso e baixo custo. A presença de hidroxilas na sua estrutura permite sua modificação química e reticulação das cadeias poliméricas que pode levar a diminuição de sua velocidade de degradação para que este permaneça por um período adequado no organismo, podendo ser utilizado futuramente para entrega controlada de células e para o aumento da permanência das células em locais de lesão. O projeto de pesquisa, trata-se de desenvolver um hidrogel a base de amido de milho modificado e reticulado por reação de Diels-Alder visando carreamento e liberação de células. Para isso, o amido foi gelatinizado, oxidado, esterificado e reticulado. Estas modificações foram comprovadas através de microscopia óptica (MO), eletroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), titulação condutimétrica e ressonância magnética nuclear de prótons (RNM-1H). A viabilidade celular das amostras de amido (natural, oxidado, esterificado e reticulado) e dos reagentes, foi determinada utilizando o método MTT. Através do FTIR é possível observar que na amostra de amido controle, não há aparecimento das bandas de 1600 e 1420 cm^{-1} correspondentes aos grupamentos C=O; já na amostra de amido oxidado houve o aparecimento destas e, na amostra de amido esterificado houve diminuição dessas bandas e, além disso, o aparecimento em 885 cm^{-1} da banda correspondente aos anéis furânicos, sendo sugestivo da substituição esterificação com furano. Para isso, determinou-se quantitativamente através da titulação condutimétrica que o grau de substituição foi aproximadamente de 13%. Confirmou-se o resultado através do RNM-1H, em que foi possível visualizar grupamentos furânicos na amostra de amido esterificado. Além disso, a reticulação do material teve êxito após a análise visual, em que houve a formação do hidrogel. Sugere-se que as modificações do amido e a reticulação por DA foram realizadas com sucesso. Os testes de viabilidade celular indicaram que as amostras apresentaram-se atóxicas em todas as etapas da

modificação do material (oxidação, esterificação e reticulação) e em todas concentrações testadas. Conclui-se assim que o biomaterial desenvolvido se demonstrou promissor para aplicações potenciais na área da saúde, por exemplo, na medicina regenerativa.

Palavras-chave: Amido modificado. *Click chemistry*. Biopolímero. Biomaterial. Derivados furânicos. Bismaleimida.

ABSTRACT

The search for new materials derived from biopolymers has received increasing attention due to its potential applicability in several sectors, including the biomedical area. Despite the many advantages, biopolymers still find little application in the biomedical area due, among others, to the limited mechanical properties and the rapid biodegradability under physiological conditions, which is the case of starch, for example. Starch is a polymer from a renewable natural source, with high availability, high biocompatibility and biodegradability, solubility in aqueous medium and low cost. The presence of hydroxyls in its structure allows its chemical modification and crosslinking of the polymeric chains, which can lead to a decrease in its degradation speed so that it remains for an adequate period in the body, and can be used in the future for controlled delivery of cells and for the increase the permanence of the cells in injury sites. The research project is about developing a hydrogel based on corn starch modified and cross-linked by Diels-Amieiro reaction to the carrying and releasing of cells. For this, the starch was gelatinized, oxidized, esterified and cross-linked. These modifications were confirmed by optical microscopy (MO), Fourier transform infrared electrosopy (FTIR), conductivity measurement and proton nuclear magnetic resonance (RNM-1H). The cell viability of the starch samples (natural, oxidized, esterified and cross-linked) and the reagents was determined using the MTT method. Through the FTIR it is possible to observe that in the control starch sample, there is no appearance of the 1600 and 1420 cm^{-1} bands corresponding to the C = O groups; in the oxidized starch sample they appeared, and in the esterified starch sample there was a decrease in these bands and, in addition, the appearance in 885 cm^{-1} of the band corresponding to the furan rings, suggesting the substitution of COOH in furan. For this, it was quantitatively determined through conductometric titration that the degree of substitution was approximately 13%. And the result was confirmed by the RNM-1H, in which it was possible to visualize furanic groups in the esterified starch sample. In addition, the crosslinking of the material was successful after the visual analysis, in which the hydrogel was formed. And it is suggested that the starch modifications and DA cross-linking were successfully carried out. Cell viability tests showed that in all stages of material modification (oxidation, esterification and crosslinking) and in all concentrations tested, the samples were viable. It is concluded

that the biomaterial developed was shown to be promising for potential applications in the health area, for example, in regenerative medicine.

Keywords: Modified starch. Click chemistry. Biopolymer. Biomaterial. Furan derivatives. Bismaleimide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do amido	19
Figura 2 – Gelatinização do amido.....	20
Figura 3 – Etapas processo de gelatinização do amido	21
Figura 4 – Estrutura química reagente TEMPO	23
Figura 5 – Reação de oxidação da celulose com reagente TEMPO	24
Figura 6 – Oxidação do amido com NaBr, TEMPO, NaOCl e NaOH	24
Figura 7 – Mecanismo ação geral da esterificação	25
Figura 8 – Mecanismo ação esterificação de Fischer	26
Figura 9 – Reação de Esterificação	27
Figura 10 – Reticulação amido por reação de DA.....	28
Figura 11 – Reações Click chemistry	29
Figura 12 – Reação DA – Furano e bismaleimida.....	30
Figura 13 – Furanos e derivados.....	32
Figura 14 – Esquema inspiração para o desenvolvimento do biomaterial	37
Figura 15 – Representação esquemática dos objetivos do trabalho	41
Figura 16– Sequência da oxidação com reagente TEMPO	43
Figura 17 – Sequência da reação de esterificação	44
Figura 18 – Titulação condutimétrica amostras amido	46
Figura 19 – Fórmula estrutural bismaleimida	46
Figura 20 – Sequência da reação reticulação do amido por reação de DA	47
Figura 21 – Sequência da gelatinização amido.....	49
Figura 22 – MO (100X) – Gelatinização do amido	50
Figura 23 – Microscopia da gelatinização do amido em diferentes temperaturas ...	50
Figura 24 – FTIR das amostras de amido	53
Figura 25 – Comparação literatura FTIR de amido natural e oxidado TEMPO	54
Figura 26 – Titulação condutimétrica	55
Figura 27 – Resultados titulação condutimétrica das amostras de amido.....	56
Figura 28 – RMN-1H resultado das amostras de amido	57
Figura 29 – Comparação RMN-1H amido natural e oxidado	58
Figura 30 – RMN-1H de furano incorporado em polímero Polibutanodieno (PBD)	58
Figura 31 – Espectro álcool furfurílico	59
Figura 32 – Análise visual da viscosidade.....	60

Figura 33 – Comparação análise visual viscosidade em nanofibra de celulose via DA	60
Figura 34 – Teste MTT	61
Figura 35 – Resultados da análise de viabilidade celular	62

LISTA DE ABREVIÇÕES

DA	Diels-Alder
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
RMN-1H	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de Prótons
NaBr	Brometo de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaClO	Hipoclorito de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
TEMPO	N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina
MO	Microscopia Óptica
PEG	Polietileno glicol
PS	Poliestireno
PP	Polipropileno
PVA	Poliálcool vinílico
PHEMA	Metacrilato de polihidroxietil
PVA	Poliacetato de vinila
PVC	Policloreto de vinila
PHA	Polihidroxialcanoatos
HA	Ácido hialurônico
PLA	Ácido polilático
PBD	Polibutadieno
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
MTT	Brometo de [3-(4,5- dimetiltiazol 2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
OD	Densidade óptica de absorbância
FCDA	2,5-furancarboxialdeído
FDCA	2,5-furandicarboxílico ácido
PEO/PPO/PEO	Copolímeros de bloco de óxido de etileno/óxido de propileno
IC₅₀	Concentração que inviabiliza 50% das células
H₃BO₃	Ácido bórico
HCl	Ácido clorídrico
HNO₃	Ácido nítrico
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
OH	Hidroxila
COOH	Ácido carboxílico
ETHPA	Exo-3,6-epoxi-1,2,3,6-tetrahidroftálico anidrido
TTDDA	10-trioxa-1,13-tridecanodiamina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1.	Polímeros	17
2.2.	Amido de milho	17
2.3.	Gelatinização e retrogradação do amido	19
2.4.	Modificações no amido	22
2.4.1.	Reação de oxidação	22
2.4.2.	Esterificação	25
2.4.3.	Reticulação (Crosslinking)	27
2.5.	<i>Click chemistry</i> e reação de DA	28
2.6.	Aplicação de Furanos no desenvolvimento de polímeros	30
2.7.	Hidrogéis poliméricos: definições, tipos, características gerais, fontes de obtenção e suas aplicações	33
2.7.1.	Aplicações de hidrogéis na engenharia de tecidos e medicina regenerativa	35
3	OBJETIVOS	40
3.1.	Objetivo geral	40
3.2.	Objetivos específicos	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1.	Materiais	42
4.2.	Gelatinização do amido de milho	42
4.3.	Oxidação do amido	42
4.4.	Separação por precipitação	43
4.5.	Reação de esterificação – Inserção grupamentos furanos	44
4.6.	Caracterização química – etapas de oxidação e esterificação	45

4.7.	Reticulação furano-bismaleimida por reação de DA	46
4.8.	Ensaio de citotoxicidade celular	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
5.1.	Resultados etapa de gelatinização do amido – MO	49
5.2.	Rendimento (η)	51
	Foi realizado o cálculo de Rendimento (η) no amido esterificado (Eq. 1) utilizando a massa inicial (antes da purificação) e a massa final (após completa purificação do material). Que resultou em $\eta = 49,29\%$	51
5.3.	Caracterizações das etapas oxidação e esterificação	51
5.3.1.	Eletroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	51
5.3.2.	Titulação condutimétrica	54
5.3.3.	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN-1H).....	56
5.4.	Reticulação do amido por reação de DA.....	59
5.4.1.	Análise visual de viscosidade e formação do hidrogel.....	59
5.5.	Citotoxicidade celular - MTT.....	60
6	CONCLUSÃO.....	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1 INTRODUÇÃO

A busca por novos conhecimentos biotecnológicos na melhoria da saúde mundial representa relevância científica e é destaque nos principais jornais científicos na esfera mundial. Espera-se que a partir dos conhecimentos atualmente publicados como resultados de pesquisa permitam ao longo dos anos alcançarmos diversas melhorias para tratamento de doenças. Existem diversos materiais no mercado sendo eles autólogos, homólogos, heterólogos e aloplásticos. Os autólogos são materiais obtidos de tecidos do próprio indivíduo e apresentam desvantagens por ser uma técnica associada à morbidade, gerar dor, perda de função temporária, limitada quantidade de material disponível e por precisar gerar uma área cirúrgica adicional (invasivo). Já os materiais homólogos são obtidos normalmente de banco de ossos humanos, mas apresentam risco de rejeições. Os heterólogos são obtidos de outras espécies animais e possuem desvantagem por terem ainda mais diferenças antigênicas do que os materiais homólogos. Atualmente são utilizados em odontologia, sem aplicações em outros tecidos que exigem maior volume de enxerto. Os materiais aloplásticos são de origem natural ou sintética e quando degradáveis, são preferidos para a medicina regenerativa por evitarem a invasividade de uma segunda cirurgia para sua remoção.

No que se refere a materiais utilizados para liberação de células para reparo tecidual, existem diversos descritos na literatura, como por exemplo, o alginato, o PLA, colágeno, ácido hialurônico e fibrina. O importante desafio quando se desenvolve um material visando aplicação biológica para carreamento de células, por exemplo, é garantir que células permaneçam viáveis em seu interior, isto é, sejam liberadas vivas nos tecidos alvos. Além disso, devem ser degradáveis no organismo com o passar do tempo, devem ser atóxicos e biocompatíveis. Entretanto, dificilmente os materiais existentes apresentam todas essas características, gerando uma demanda pela busca e estudo das propriedades de novos materiais para este fim. Hidrogéis são polímeros hidratados e reticulados, que podem ser utilizados na medicina regenerativa como biomateriais para entrega controlada de moléculas, encapsulamento e carreamento de células, visando regeneração tecidual. Diversos materiais são utilizados na medicina regenerativa com este objetivo, sendo representados principalmente por polímeros. Apesar das muitas vantagens que apresentam, vários biopolímeros ainda encontram pouca aplicação na área biomédica devido, dentre outras, às limitadas

propriedades mecânicas e à rápida biodegradabilidade em condições fisiológicas, que é o caso do amido, por exemplo. O amido é um polímero de fonte natural renovável, de alta disponibilidade, apresenta alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, solubilidade em meio aquoso e baixo custo. Na tentativa de contornar os problemas relacionados à rápida biodegradação e baixa resistência mecânica do amido, este projeto trata especificamente da aplicação da reação *click* de DA para a reticulação do mesmo, visando à obtenção de hidrogéis a base de amido de milho mecanicamente autossustentáveis para liberação de células.

A presença de grupos funcionais hidroxila na estrutura do amido permitem sua modificação química. Uma das maneiras de melhorar as propriedades mecânicas de polímeros é, de forma geral, através da reticulação (*crosslinking*) das cadeias poliméricas, o que também pode levar a uma diminuição de sua velocidade de degradação para que este permaneça por um período de tempo adequado no organismo.

Para que seja possível a reticulação do amido por reações de DA é necessário que em sua estrutura haja a presença de grupamentos específicos, no caso desta proposta, os grupamentos furano. Para a inserção dos grupamentos furano o amido será oxidado (utilizando-se reagente TEMPO), o que leva à formação de grupamentos carboxila em sua estrutura. Estes grupamentos serão então acoplados aos grupamentos furano deixando o grupamento exposto (pendente) na estrutura, passível de reação. O método a ser utilizado é descrito detalhadamente na metodologia do trabalho. As moléculas de amido substituído com grupamentos furanos serão reticuladas através da introdução de um agente reticulante, no caso do presente trabalho, uma bismaleimida sob sistema de aquecimento (36/40°C).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Polímeros

Polímeros são macromoléculas formadas pelas ligações químicas entre os monômeros. Os polímeros sintéticos têm sido utilizados há anos para substituição de função mecânica dos tecidos, como dentes, ossos e articulações, porém, seu uso é limitado devido alguns polímeros apresentarem baixa biocompatibilidade e biodegradação no organismo (Kharkar, Kiick e Kloxin, 2013). Entre os polímeros sintéticos mais utilizados podemos citar o polietileno glicol (PEG), poliestireno (PS), polipropileno (PP), poliálcool vinílico (PVA), metacrilato de polihidroxietil (PHEMA), poliálcool vinílico (PVA), policloreto de vinila (PVC), poliacrilonitrila entre outros (Kharkar, Kiick e Kloxin, 2013).

Já os polímeros de fontes naturais e seus derivados, possuem diversas aplicações e vantagens significativas em diferentes campos de estudo. Entre esses polímeros naturais, podemos citar como exemplo o ácido hialurônico (Nimmo, Owen e Shoichet, 2011), polihidroxialcanoatos (PHA) (Brito *et al.*, 2011), quitosana, alginato, heparina, fibrina, ácido desoxirribonucleico (DNA), celulose (algodão, papel, viscose, celulose bacteriana, carboximetilcelulose (CMC)), colágeno, gelatina, sulfato de condroitina, agarose, dextrano, lã, seda e um dos mais abundantes, o amido (batata, mandioca, arroz, trigo, aveia e milho) (Kharkar, Kiick e Kloxin, 2013)(Brito *et al.*, 2011).

2.2. Amido de milho

O amido é utilizado há décadas na indústria de embalagens, alimentos e farmacêutica. Seu campo de aplicação é crescente devido suas propriedades, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade (Singh, Nath e Singh, 2010) e devido suas inúmeras vantagens, como possuir baixo custo, ser de origem natural, atóxico e possuir estrutura que permite modificações químicas. Além da aplicabilidade tradicional (alimentação), ele também pode ser usado para diversos outros fins, como por exemplo para engenharia de tecidos, transporte de medicamentos e/ou células, cicatrização de feridas e modificação química (Rajan, Sudha e Abraham, 2008).

Na área da saúde, o amido é amplamente utilizado como ingrediente primordial no desenvolvimento de comprimidos e cápsulas, implantes subcutâneos e matriz para

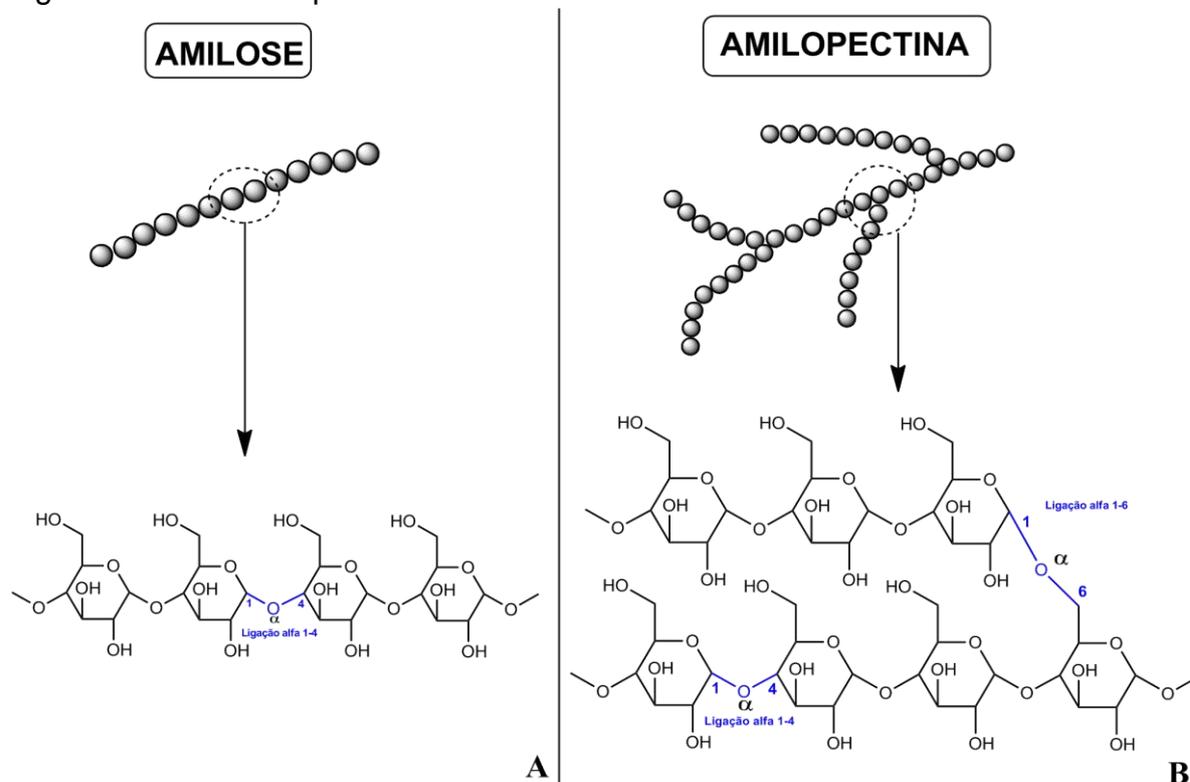
sistemas de liberação de medicamentos (Mano, Koniarova e Reis, 2003). Além disso, seu caráter hidrofílico, permitem seu uso no corpo humano e animal, como *scaffolds* e outros dispositivos (Rajan, Sudha e Abraham, 2008). As propriedades dos materiais à base de amido permitem controlar a porosidade, o tamanho dos poros, a morfologia dos poros e a forma dos *scaffolds*, gerando ambientes adequados para vários tipos de células crescerem, aderirem e proliferarem (Gomes *et al.*, 2006). Testes *in vitro* que vem sendo feito, mostram alta biocompatibilidade de polímeros à base de amido com osteoblastos e células endoteliais, demonstrados por testes de citotoxicidade, proliferação celular e adesão celular (Ghanaati *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2010), sendo assim, um material potencial para a preparação de biomateriais para uso interno visando aplicação em medicina regenerativa.

Diante disso, diversos produtos à base de amido natural foram desenvolvidos para aplicação na medicina regenerativa e engenharia de tecidos, sendo utilizados para diversas atividades de bioengenharia, incluindo cartilagem, medula espinhal, pele e engenharia de tecidos das cordas vocais (Kharkar, Kiick e Kloxin, 2013). Além disso, o amido pode ser aplicado também na administração de medicamentos e cicatrização de feridas (Mano, Koniarova e Reis, 2003). O uso de polímeros bioabsorvíveis para esse fim, tem crescido constantemente, principalmente porque após a cicatrização tecidual o implante não precisa ser removido evitando procedimentos cirúrgicos que se fazem necessários quando materiais não reabsorvíveis são usados para cicatrização de tecidos. Devido a essa degradação e reabsorção, o amido fornece uma alternativa interessante no reparo e substituição de tecidos. Entretanto, dependendo da aplicação, a rápida degradação que o amido apresenta nas condições corporais representa uma desvantagem, no entanto, pode ser minimizada através de modificações químicas (reticulações) (Carvalho *et al.*, 2003).

Essas modificações químicas no amido ocorrem, devido à molécula de amido possuir grupos hidroxila nas estruturas da cadeia, que se tornam acessíveis aos reagentes eletrolíticos (Rajan, Sudha e Abraham, 2008). Quimicamente, o amido é formado por dois principais componentes macromoleculares, amilose e amilopectina. A amilose é uma macromolécula linear predominantemente α -(1 \rightarrow 4)-d-glucopiranosil linear. A amilopectina é uma macromolécula altamente ramificada e de alto peso molecular composta principalmente de unidades α -(1 \rightarrow 4)-d-glucopiranosose, com α -

(1→6) ligações a intervalos de aproximadamente 20 unidades (Fig. 1) (Carvalho, 2008).

Figura 1 – Estrutura química do amido



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: A – Estrutura química amilose; B – Estrutura química amilopectina.

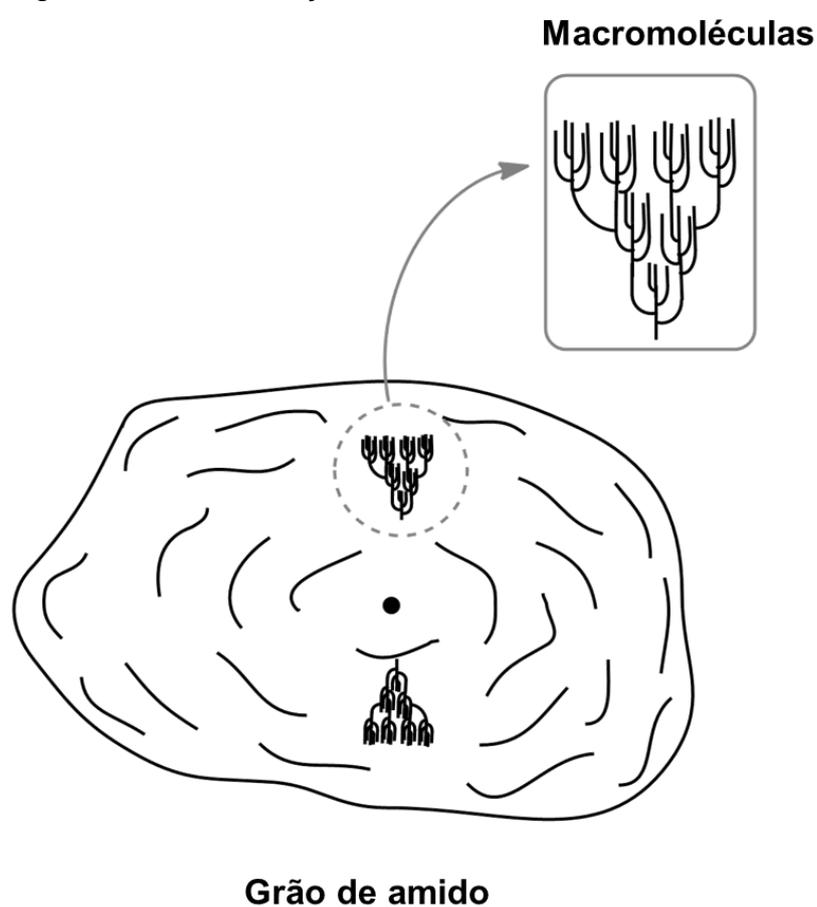
Diante disso, o amido modificado torna-se certamente um material muito versátil para uso potencial na tecnologia de polímeros, sendo capaz de gerar uma ampla gama de materiais com propriedades interessantes.

2.3. Gelatinização e retrogradação do amido

Os grãos de amido em contato com água fria incham de 10-20%, devido à difusão e absorção de água nas regiões amorfas, mas este inchamento é um processo reversível com a secagem. Já quando os grãos são aquecidos em água a temperaturas maiores e atingem um ponto em que grãos apresentam um fenômeno irreversível, pois perdem a ordem estrutural devido à fusão dos cristais levando a um aumento na viscosidade da amostra. Os processos de ruptura da estrutura granular, o inchamento, a hidratação e solubilização das moléculas de amido, caracterizam o processo de gelatinização ou gelatinização (Storpirtis, 2006). Além disso, outra característica importante desse processo é a temperatura ótima de gelatinização (Fig.

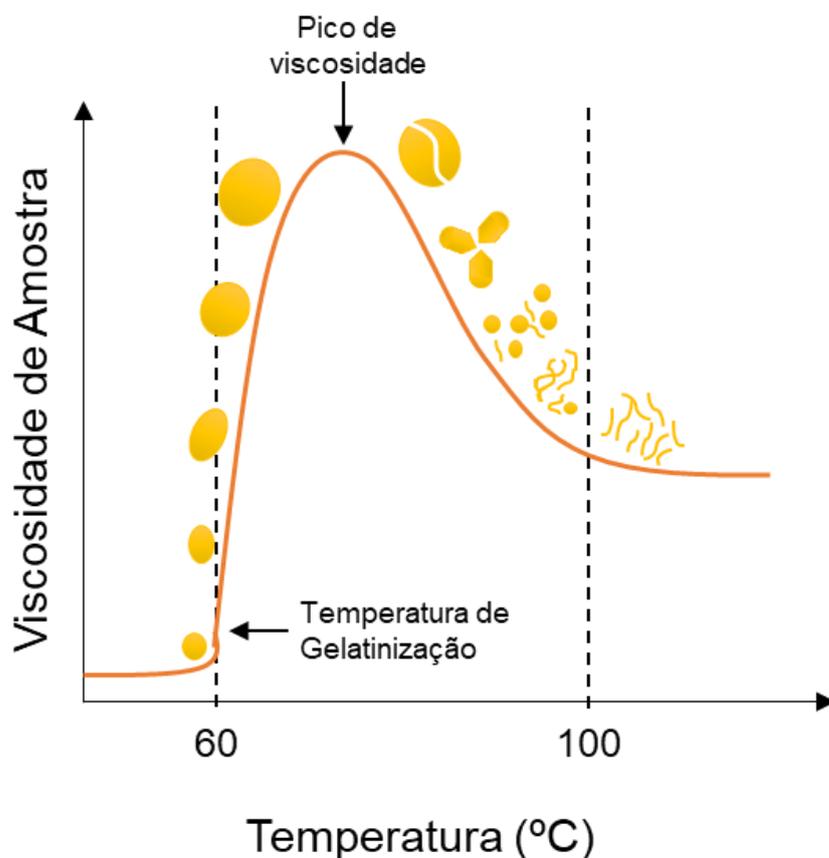
3). Cada fonte de amido possui uma temperatura de gelatinização diferente, sendo que a das raízes e tubérculos, apresentam temperatura de gelatinização menor, como por exemplo a temperatura de gelatinização da batata é de 58-65°C, mandioca 52-65°C e a de amidos de cereais, como milho 62-80°C e trigo 59-85°C (Motarjemi e Lelieveld, 2014). Esse aquecimento do amido em água promove a ruptura das ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas (Motarjemi e Lelieveld, 2014), expondo assim as macromoléculas, tais como as hidroxilas (OH) (Fig. 2).

Figura 2 – Gelatinização do amido



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 3 – Etapas processo de gelatinização do amido



Cada fonte de amido possui sua temperatura específica de gelatinização.

Fonte: Elaborada pela autora, adaptado de Food Ingredients Brasil, 2015, p. 44.

Outra etapa que ocorre durante o processo de gelatinização do amido é a retrogradação, esse processo se dá devido à redução de temperatura durante o resfriamento do gel e resultando na reaproximação das moléculas, ocorrendo formação de ligações de hidrogênio intermoleculares e a liberação da água existente entre as moléculas (sinérese). Esse processo ocorre na maioria das vezes em amidos com altos teores de amilose, resultando na contração, aumento da firmeza e aumento da opacidade do gel (CEREDA *et al.*, 2002; Food Ingredients Brasil, 2015).

Após a finalização do processo de gelatinização do amido, as macromoléculas e hidroxilas ficam expostas, sendo possível a ocorrência de reações e modificações químicas na molécula.

2.4. Modificações no amido

Os amidos naturais (nativos) vêm sendo utilizados por tempos como componentes de diferentes produtos, como por exemplo na indústria alimentícia, indústria de papel, de embalagens entre outros, porém sua aplicação se torna limitada em função das condições de processamento, como temperatura e pH, que restringem sua aplicação em escala industrial. Para solucionar tais limitações são necessárias modificações no amido, podendo ser elas modificações enzimáticas, físicas ou químicas (Exam. Anal. Starch Starch Prod., 1976). Essas modificações podem ser realizadas por reações de oxidação, esterificação e reticulação (Food Ingredients Brasil, 2015).

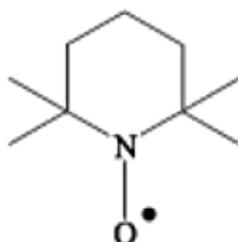
2.4.1. Reação de oxidação

Os amidos podem ser oxidados com diferentes métodos e reagentes, tais como o hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, o persulfato de amônio, o permanganato de potássio, o peróxido de hidrogênio, o ácido peracético, o cloridrato de sódio e os perboratos e ácidos hipoclorídicos. Para que a reação ocorra é necessário quantidades específicas de reagente, em pH e temperatura controladas (Kuakpetoon e Wang, 2001; Sumerly *et al.*, 2003). A reação de oxidação ocorre quando os grupos hidroxila da molécula de amido são oxidados em grupos carbonila e, posteriormente, a grupos carboxila. O número de grupos carbonila e carboxila indicam o grau de oxidação do amido, sendo que esses grupos são originados nas hidroxilas dos carbonos nas posições dois, três e seis. A reação de oxidação do amido é acompanhada de quebra de ligações glicosídicas, com parcial despolimerização do amido (WURZBURG, 1986). Uma das técnicas de oxidação é com a utilização do reagente TEMPO, hipoclorito de sódio (NaClO) e brometo de sódio (NaBr).

Um dos métodos de oxidação atualmente muito utilizado tanto em processos industriais como acadêmicos é com a utilização do reagente TEMPO (Fig. 4), que tem como vantagem ser capaz de oxidar álcoois primários e secundários em condições brandas, seletivas e com tempo reacional reduzido, sendo utilizado em quantidades catalíticas e podendo ser empregado em presença de sensíveis grupos funcionais. Outra vantagem significativa na utilização do TEMPO como reagente de oxidação, é a sua não reatividade em presença de ar, umidade ou luz podendo então ser estocado

e utilizado sem condições especiais, o que representa vantagem sobre um grande número de reagentes de oxidação (Souza, 2004). Diante do exposto o reagente TEMPO foi escolhido para ser utilizado na reação de oxidação do presente trabalho de pesquisa.

Figura 4 – Estrutura química reagente TEMPO

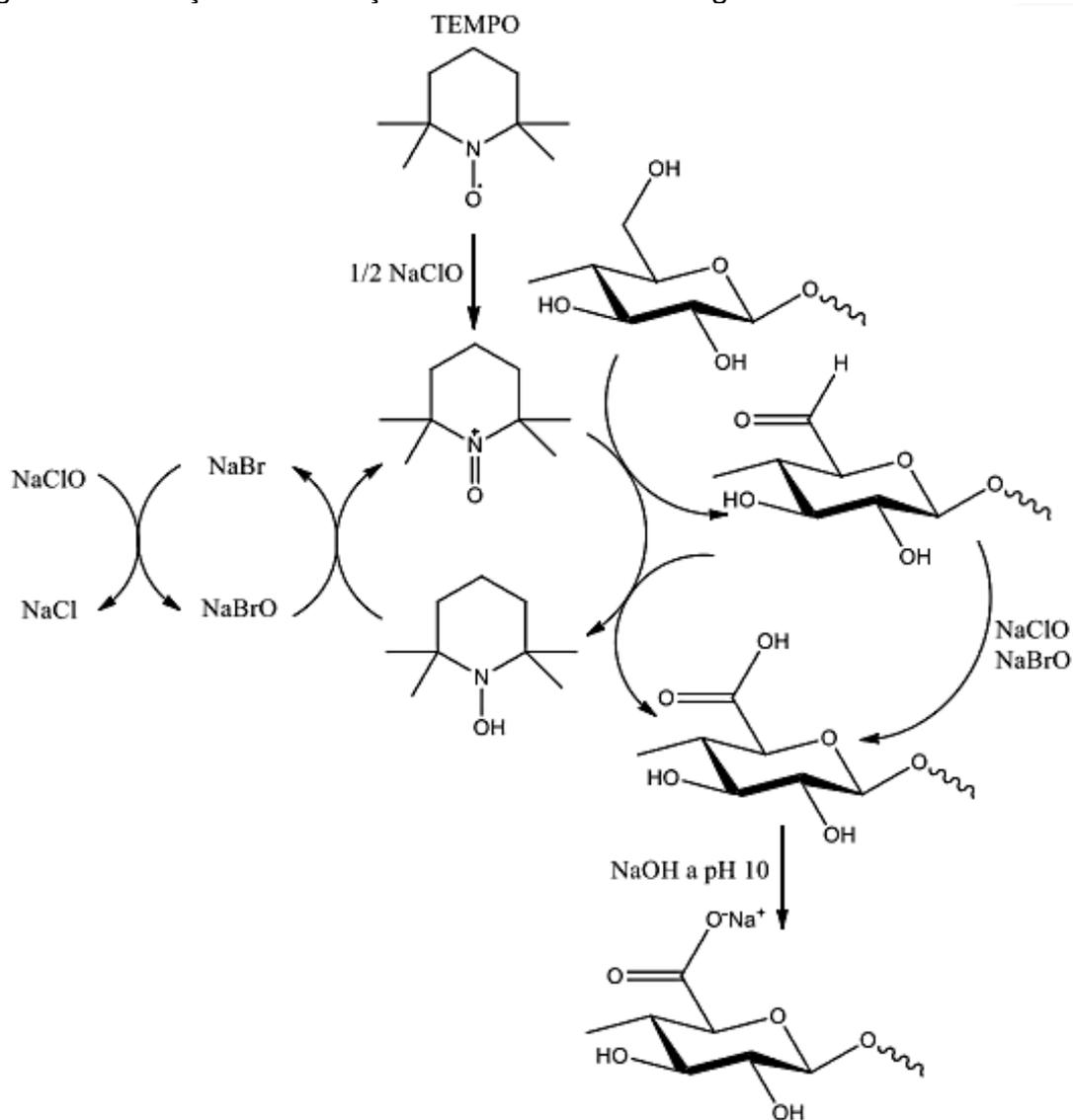


Fonte: Souza, 2004, p. 1.

O mecanismo de ação da reação de oxidação via reagente TEMPO em celulose ou amido, por exemplo, ocorre em meio aquoso. O reagente TEMPO atua na oxidação regiosseletiva dos álcoois primários em aldeídos que em seguida o oxida em ácido carboxílico ou íons carboxilatos. O reagente hipoclorito de sódio atua na reação como ativador do reagente TEMPO em sal oxoamônio que é um oxidante primário da hidroxila, gerando aldeído e posterior caboxilato. O reagente brometo de sódio atua como catalisador e re-oxidante da hidroxilamina em íon oxoamônico e em meio alcalino (pH 10-11) resulta na reação regiosseletiva do grupamento aldeído posicionado no carbono C-6, gerando grupamento de ácido carboxílico (Fig. 5) (Montiel-Herrera *et al.*, 2015).

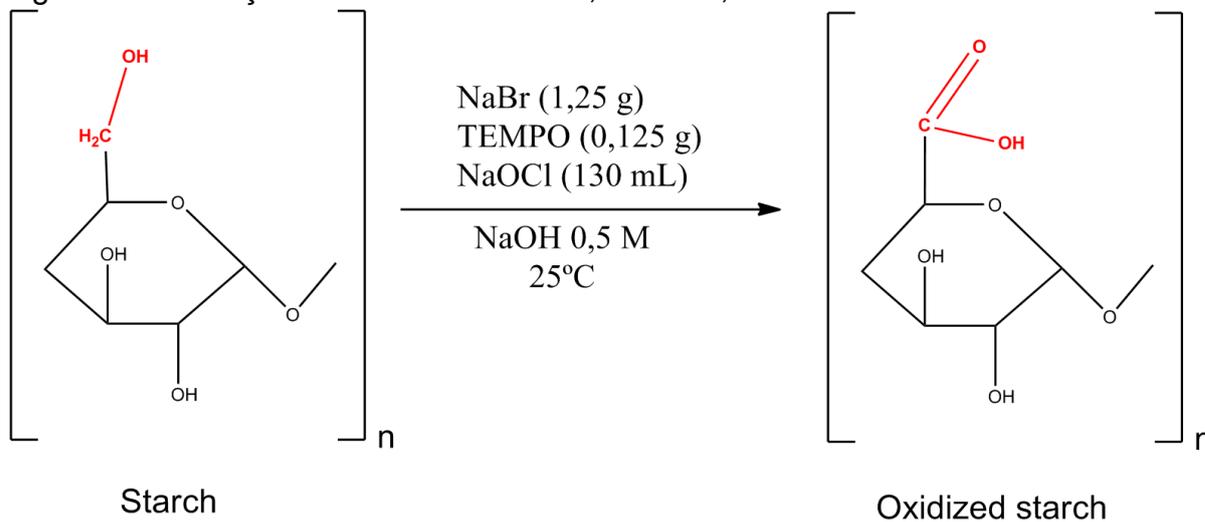
Diversos estudos demonstram a reação de oxidação através do TEMPO em fibras de celulose e em amido. O princípio básico dessa técnica consiste em oxidar-se de forma altamente seletiva o carbono 6 dos grupos hidroxilos primários em meio aquoso introduzindo grupos funcionais carboxílicos e grupos aldeídos com carga iônica, criando repulsões eletroestáticas fortes entre as fibrilas, levando a que se separem (Pierre *et al.*, 2017). Os grupos aldeídos são completamente oxidados em grupos carboxílicos (Fig. 6).

Figura 5 – Reação de oxidação da celulose com reagente TEMPO



Fonte: (Isogai, Saito e Fukuzumi, 2011; Pierre et al., 2017).

Figura 6 – Oxidação do amido com NaBr, TEMPO, NaOCl e NaOH

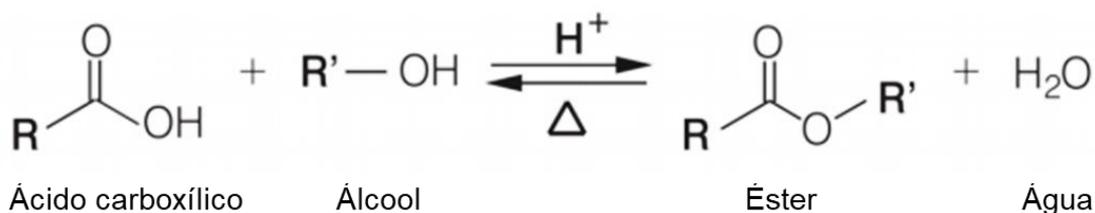


Fonte: Elaborada pela autora.

2.4.2. Esterificação

A esterificação de Fisher é uma reação de condensação usada para síntese de ésteres, ocorre quando um ácido carboxílico reage com um álcool na presença de um catalisador ácido mineral produzindo como subproduto éster e água, o mecanismo de ação geral dessa reação está ilustrada abaixo (Fig. 7) (Costa *et al.*, 2004). Os ácidos minerais geralmente utilizados como catalisadores nas reações de esterificação são o ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido fluorídrico (HF), ácido fosfórico (H₃PO₄) e o ácido clorídrico (HCl).

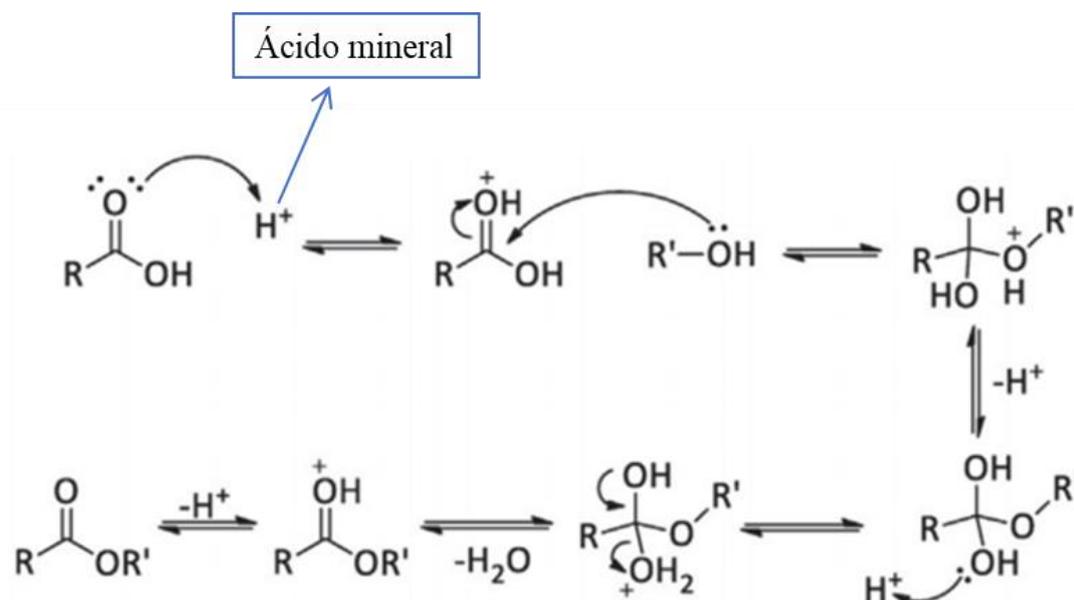
Figura 7 – Mecanismo ação geral da esterificação



Fonte: Adaptado de Moraes Calvalcante *et al.*, 2015, p. 321.

A esterificação de Emil Fischer é uma reação de substituição nucleofílica catalisada por ácido mineral, envolvendo um ácido carboxílico e um álcool. Seu mecanismo de ação se dá pela reação em que o ácido mineral (como por exemplo ácido bórico (H₃BO₃), ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO₃) e ácido sulfúrico(H₂SO₄)) protona o átomo de oxigênio do grupo carbonila, a partir disso, o ácido carboxílico protonado se torna mais reativo ao ataque nucleofílico do álcool gerando um intermediário tetraédrico. Posteriormente, um segundo intermediário tetraédrico é gerado a partir da transferência de um próton de um oxigênio para outro e converte o grupo OH em um bom grupo de saída. Através da perda de um próton, ocorre a regeneração do catalisador ácido, originando éster e água (Fig. 8) (Costa *et al.*, 2003; (Moraes Calvalcante *et al.*, 2015).

Figura 8 – Mecanismo ação esterificação de Fischer

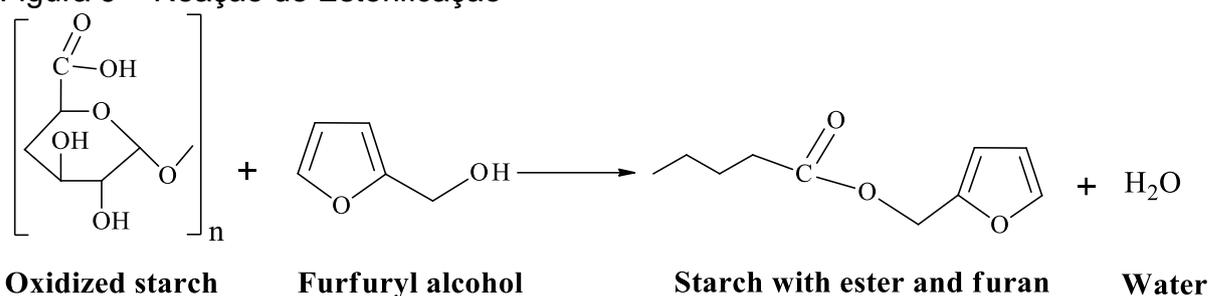


Fonte: Adaptado de Moraes Calvalcante *et al.*, 2015, p. 322.

Uma reação de esterificação clássica amplamente utilizada é com o uso do ácido cítrico, utilizada na reação de reticulação com moléculas bioativas proveniente da biomassa de amido, fibras de celulose ou milho. Diversos estudos descrevem a síntese de poliésteres biodegradáveis tendo o ácido cítrico como base, porém todos eles têm como desvantagem o uso de catalizadores metálicos, o que pode significar riscos para o uso biológico e a importância do estudo de novos materiais (Noordover *et al.*, 2007). Além disso, na esterificação com ácido cítrico já ocorre na mesma etapa a reticulação irreversível do material, não sendo possível controlar o aumento da viscosidade apenas quando há a inserção de agentes reticulantes. No presente trabalho buscou-se um material que não apresentasse tais limitações.

Para isso, o amido oxidado (com grupamentos carboxílicos em sua estrutura) foi esterificado com álcool furfúrico, que possui grupamentos furanos em sua estrutura que foram acoplados a molécula de amido modificado (Fig. 9). Após essa reação os grupamentos furanos ficaram expostos e passíveis de reações químicas, como por exemplo, reações de reticulação.

Figura 9 – Reação de Esterificação



Fonte: Elaborada pela autora.

2.4.3. Reticulação (Crosslinking)

A reticulação das cadeias poliméricas, processo também denominado por reação de entrecruzamento, é um tipo de modificação química que tem função de unir as cadeias poliméricas, ou seja, ligar suas cadeias às de outros polímeros gerando redes poliméricas híbridas (De *et al.*, 2011). As reticulações tem por objetivos principal modificar determinadas propriedades dos biopolímero como por exemplo a estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade, cor e a biodegradação (Neto *et al.*, 2005).

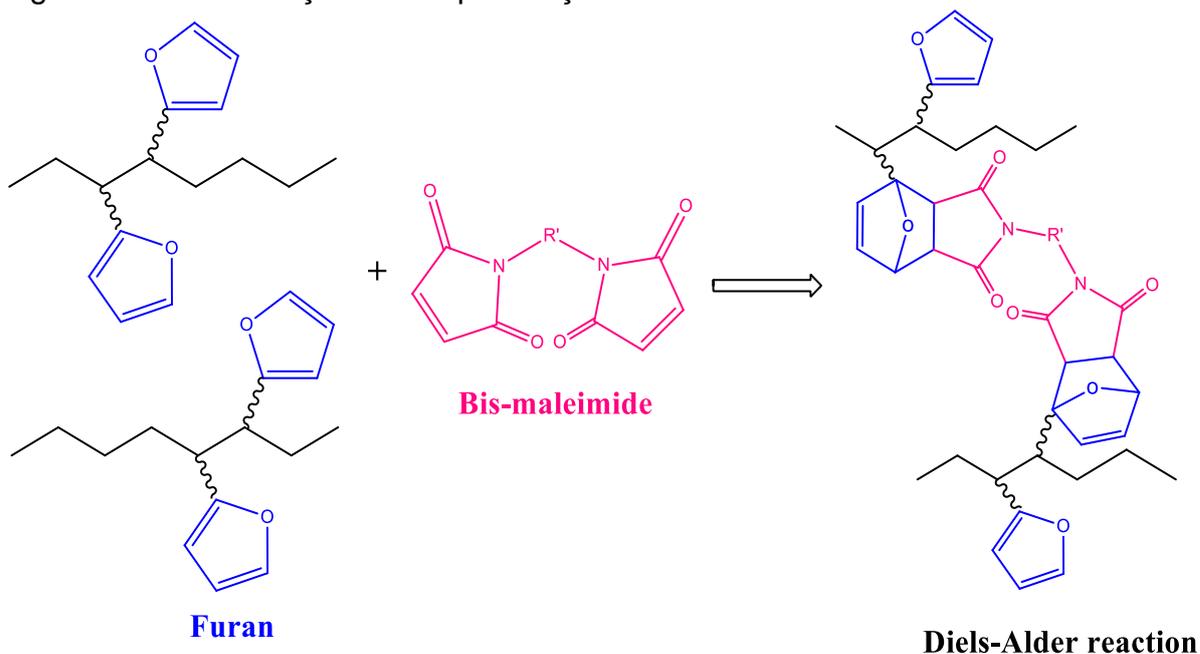
As reticulações podem acontecer via interações covalentes ou via interações físicas (iônicas). As reticulações físicas (iônicas), tem por características ter um mecanismo reacional simples e procedimento experimental realizado em etapa única, mas em contrapartida o mesmo demonstra menor estabilidade, devido à alta sensibilidade a alterações de pH e da força iônica do meio, além disso, essas características da reação tornam o processo de reticulação reversível (Yi, Wang e Liu, 2003). Já as reticulações por interações covalentes, ocorrem por mecanismos reacionais variados e dependentes do tipo de agente de entrecruzamento empregado. Essas reações ocorrem unindo de forma irreversível sítios reativos de cadeias poliméricas diferentes através de ligações químicas intermoleculares, ou regiões distintas de uma mesma cadeia por meio de ligações químicas intramoleculares (Lee *et al.*, 2001).

A reação de DA, consiste na adição do dieno ao alceno envolvendo o compartilhamento de elétrons inter e intra moleculares para a formação da estrutura base (o cicloexeno), ou seja, há formação de ligações covalentes, porém o procedimento apresenta certas vantagens em relação à reticulação covalente convencional, tais como, não gerar subprodutos na reação, os experimentos podem

ser conduzidos em temperatura ambiente, apresenta reversibilidade e, outras características que serão abordadas no próximo subitem.

A Figura 10 representa a reação de DA mostrando o acoplamento do heterociclo furano ligado em uma macromolécula de polímero com uma bismaleimida, levando à reticulação por reação de DA destas macromoléculas.

Figura 10 – Reticulação amido por reação de DA



Fonte: Elaborada pela autora.

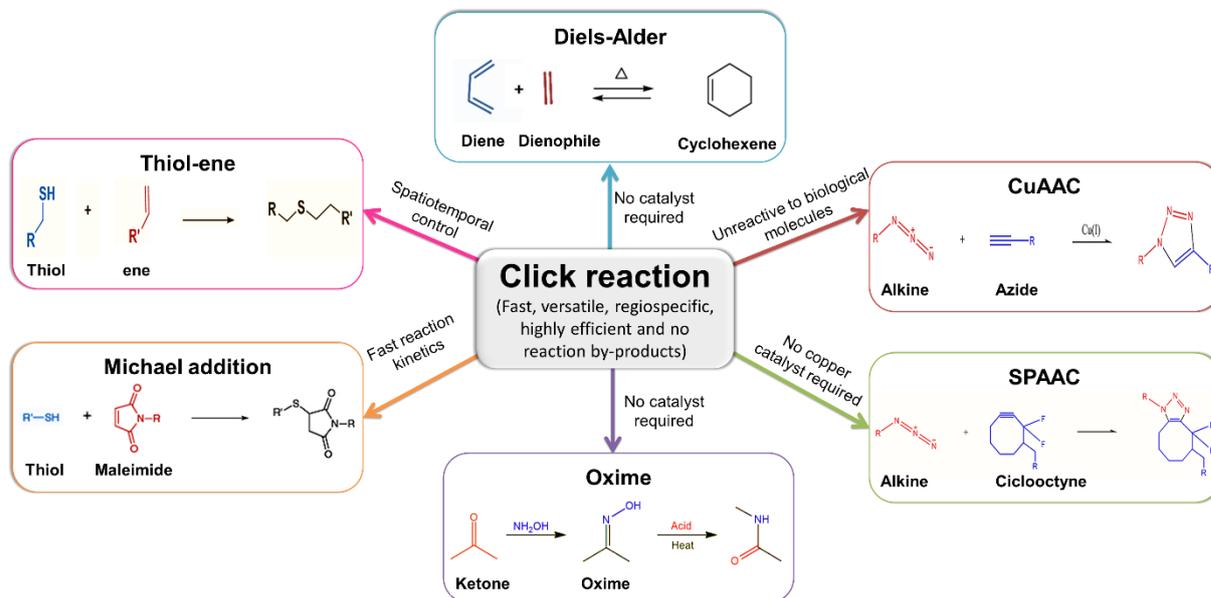
2.5. Click chemistry e reação de DA

Reações *click chemistry* são uma classe de reações químicas que tem como vantagem serem rápidas, versáteis, régio-específicas, altamente eficiente, geralmente produzem um único produto e não deixando subprodutos de reação. São métodos interessantes para síntese de hidrogéis compatíveis com células, que podem ser usados para cultura celular controlada, engenharia de tecidos e aplicações de liberação controlada (Kharkar, Kiick e Kloxin, 2013). No campo biomédico, tornou-se uma ferramenta poderosa para a síntese de polímeros para entrega de medicamentos, preparação e funcionalização de sistemas de administração de medicamentos em nanoescala e surgiu como um método eficiente de reticulação para a preparação de hidrogéis (Gregoritza e Brandl, 2015).

Entre as reações de *click chemistry* mais utilizadas podemos citar a cicloadição azida-alcino catalisada por cobre (I) (CuAAC), cicloadição azida-alcino promovida por

tensão sem cobre (SPAAC), reação tiol-eno, reação oxima, Adição de tiol-Michael e a reação de Diels-Alder (DA) (Fig. 11).

Figura 11 – Reações Click chemistry



Fonte: Elaborada pela autora.

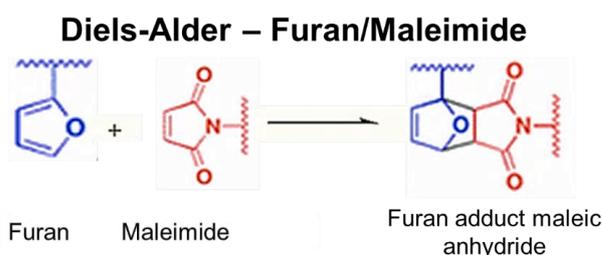
A reação de DA, foi descoberta em 1928 por Otto Diels e Kurt Alder e é uma das mais utilizadas reações para síntese de compostos orgânicos, por ter como vantagens ser um método simples, eficientes, limpo (sem subprodutos de reação) e termorreversível. Consiste em uma cicloadição entre um dieno conjugado e um dienófilo, que fornece um derivado ciclohexeno estável, chamado de aduto (Kamm e Kamm, 2004). Outra característica importante, é que a reação DA pode ser concluída à temperatura ambiente (mesmo que a cinética da reação seja lenta sob essa condição) e, além disso, a reação ocorre rapidamente na água, não sendo necessário o uso de solventes caros e tóxicos (Gregoritz e Brandl, 2015).

É utilizada em diversas áreas e para diversificadas aplicações, como por exemplo, modificação de produtos naturais e farmacêuticos, modificação do DNA e nucleotídeos e desenvolvimento de polímeros e biopolímeros (Belgacem e Gandini, 2008). Quando pensamos por exemplo na aplicação desses polímeros na área da saúde, para medicamentos e outros dispositivos, a pureza e a segurança dos materiais empregados são pré-requisitos importantes, sendo assim, a reação de DA traz benefícios, pois dificilmente é necessária uma etapa de purificação do produto, por não ser necessário nenhum catalisador e, além disso, nenhum subproduto é

formado. Devido as diversas características favoráveis, como reação em água, reação à temperatura ambiente sem o uso de catalisadores, reversibilidade, ausência de subprodutos, podemos citar também que, é um método eficaz de reticulação para preparar materiais *in situ*, como hidrogéis para administração de medicamentos e engenharia de tecidos (Gregoritza e Brandl, 2015).

Além disso, outra importante característica dessa reação, é a facilidade com que o furano e alguns de seus derivados, sofrem a reação de DA como dienos, abrindo caminho para várias abordagens originais na síntese de polímeros com a utilização de furanos (Belgacem e Gandini, 2008). No presente trabalho, a reação utilizando o aduto furano e a maleimida recebe atenção especial (Fig. 12).

Figura 12 – Reação DA – Furano e bismaleimida



Fonte: Elaborada pela autora.

2.6. Aplicação de Furanos no desenvolvimento de polímeros

O furfural é um precursor típico de monômeros de furano. É proveniente de resíduos agrícolas e florestais (recursos renováveis) contendo pentoses, como por exemplo, espigas de milho, casca de aveia e arroz, bagaço de cana, sementes de algodão, cascas de azeitona, pedras e lascas de madeira (Belgacem e Gandini, 2008). O furfural possui grande importância industrial, devido a sua produção mundial chegar à aproximadamente 300.000 toneladas/ano e, além disso, por possuir diversas aplicações como, por exemplo, na refinaria de óleos, desenvolvimento de materiais, nas indústrias farmacêuticas e agroquímicas (Corma Canos, Iborra e Velty, 2007). Destes, sabe-se que 85% são destinados para produção do álcool furfurílico (2-hidroximetilfurano) o composto furânico mais importante disponível comercialmente, obtido pela redução catalítica do furfural. O álcool furfurílico é precursor de diferentes tipos de resinas e de outros materiais com aplicações industriais. Os 15% restantes da produção do furfural, são utilizados na produção de outros compostos como o

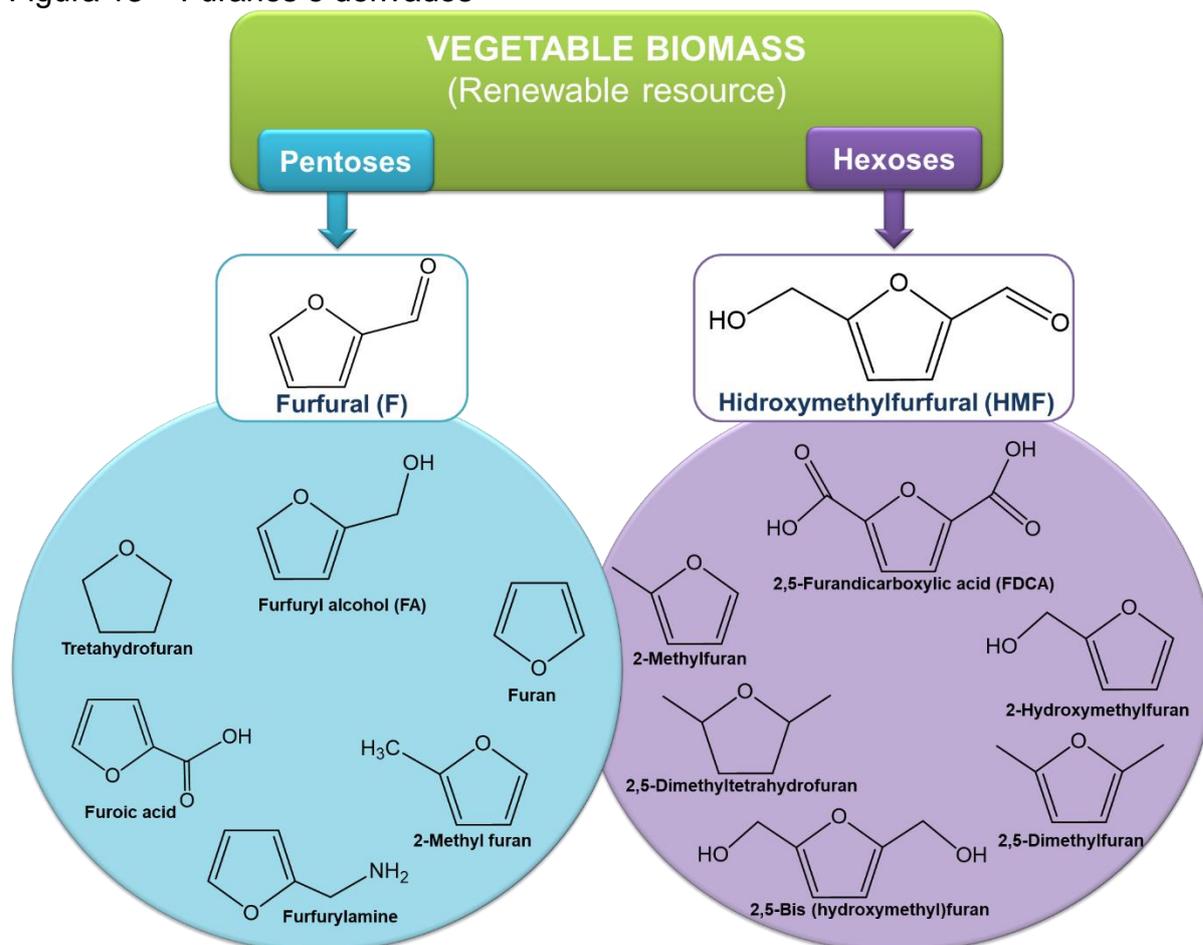
tetrahidrofurano, monômeros para síntese de materiais poliméricos, na formulação de diversas resinas termofixas com aplicações em revestimentos anticorrosivos, na formulação de adesivos, impregnação em pinturas anticorrosivas e também de outros monômeros furânicos (Gandini e Belgacem, 2014).

O álcool furfurílico é caracterizado por ser um líquido incolor, tóxico e com odor irritante. Seu processo de purificação é realizado por destilação a pressão reduzida, pois ele forma mistura azeotrópica com a água o que impede sua purificação por destilação simples. É mantido estável quando guardado em lugar frio, escuro e em presença de uma base orgânica e de um agente dessecante, geralmente emprega-se a n-butilamina para evitar a auto-resinificação (Herrmann e Köcher, 1997).

Em relação a solubilidade, este apresenta solubilidade em acetona, álcoois, éter, ésteres, derivados clorados e na maior parte dos solventes orgânicos (com exceção dos alcanos) (Bennett, 1992). Apresenta boa solubilidade em água, porém é instável neste meio. Além disso, é um composto muito reativo sendo sensível à temperatura, oxigênio e a presença de ácido (Choura, Belgacem e Gandini, 1996; Gandini e Belgacem, 2014). Frente a ácidos reage de forma enérgica e dependendo do caráter do ácido em questão, produz uma resina de cor marrom escura como produto final (Belgacem e Gandini, 2008). O espectro de absorção ótica apresenta três bandas na região do ultravioleta nos seguintes comprimentos de onda: 209nm, 230nm e 270nm. Na região do visível não apresenta absorção, é um líquido incolor (WRIGHT, 1954). Já na região do infravermelho surge um conjunto de bandas que quando associadas o identificam, sendo uma banda larga na região de 3300 cm^{-1} e outra 2980 cm^{-1} devido à presença de grupos metilênicos. O núcleo aromático responde com uma absorção através de uma banda estreita em 1501 cm^{-1} (Choura, Belgacem e Gandini, 1996; WRIGHT, 1954).

Além do furfural, existe o 5-metilfurfural que é outro importante precursor de monômeros de furano que deriva o hidroximetilfurfural um derivado furânico da primeira geração, que a partir dele fazem-se transformações gerando os monômeros furânicos (2,5-furancarboxialdeído, FCDA) ou o diácido (2,5-furandicarboxílico ácido, FDCA) (Belgacem e Gandini, 2008) que representam derivados furânicos importantes (Fig. 13).

Figura 13 – Furanos e derivados



Fonte: Elaborada pela autora.

Entre as muitas vantagens dos furanos, podemos citar uma muito importante, já citada anteriormente que é sua origem proveniente de recursos renováveis. Além disso, não há limites intrínsecos à variedade de monômeros de furano que podem ser sintetizados a partir desses precursores e, portanto, não há limite para os polímeros e copolímeros que eles podem gerar. Além disso, a facilidade com que o furano e alguns de seus derivados sofrem a reação de DA como dienos, abrindo caminho para várias abordagens originais na síntese de polímeros (Belgacem e Gandini, 2008) como, por exemplo, o desenvolvimento de hidrogéis.

O desenvolvimento de hidrogéis utilizando a reação DA, com o aduto furano-maleimida, a partir de N-vinil-2-pirrolidina, poli (Nisopropilacrilamina) ou poli (furfurilamina), ácido maleico e (monoamida-co-N-isopropil-acrilamida), demonstrou que o tempo de gelatinização, densidade de reticulação e a capacidade de inchamento dependem da concentração furano e de maleimida.

A reticulação com furanos pode gerar novos materiais/biomateriais com propriedades inovadoras para ser utilizado em diversas áreas, por exemplo, hidrogéis para uso em potencial na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa.

2.7. Hidrogéis poliméricos: definições, tipos, características gerais, fontes de obtenção e suas aplicações

Hidrogéis podem ser classificados em dois tipos, sendo eles químicos e físicos. Os hidrogéis físicos tem como característica serem obtidos através de interações físicas (forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas e os hidrogéis químicos tem por característica serem formados através de ligações covalentes (Aouada e Mattoso, 2009; Hoffman, 2012).

Já os hidrogéis químicos ou poliméricos, podem ser definidos por estruturas tridimensionais constituídas por cadeias de macromoléculas interligadas através de ligações covalentes ou interações físicas. São altamente hidrofílicos e apresentam como característica sua elevada capacidade de absorção de água ou fluidos biológicos (Almeida e Almeida, 2004; Dragan, 2014). Outros autores definem hidrogéis poliméricos como estruturas poliméricas altamente reticuladas tridimensionalmente que possuem como propriedade absorver grande quantidade de água sem perder a estabilidade dimensional. Os hidrogéis comportam-se como soluções, assim sendo, moléculas solúveis em água podem difundir-se no mesmo (Kramer *et al.*, 2019; Patel e Mequanint, 2008; Tanaka, Gong e Osada, 2005). Hidrogéis poliméricos tem a capacidade de absorver grande quantidade de água e, além disso, são compostos estruturalmente por uma ou mais redes poliméricas tridimensionalmente estruturadas, formadas por cadeias macromoleculares interligadas por ligações covalentes (reticulações) ou interações físicas (Oviedo *et al.*, 2008). Os hidrogéis poliméricos apresentam alta hidrofiliçidade e insolubilidade, sendo que a insolubilidade é afetada diretamente pelo grau de intercrossamento (reticulações ou interações físicas) das cadeias formadoras dos hidrogéis (Peppas *et al.*, 2000).

Os hidrogéis sintetizados por reticulação física, possuem transição reversível sem a necessidade de catalisadores, entretanto a resistência mecânica desses géis é inferior à dos hidrogéis de reticulação química. Já os hidrogéis obtidos por reações químicas necessitam do uso de catalisadores, tornando assim difícil a eliminação desses subprodutos e em consequência diminuem sua biocompatibilidade. Diante do

exposto, a constante busca por rotas alternativas que combinem as melhores características dos hidrogéis com um melhor controle químico de sua síntese é desejável. A reação de DA é considerada uma via muito interessante para promover a reticulação dos géis especialmente em função de serem considerados um processo limpo, que não gera subprodutos na reação (Kramer *et al.*, 2019; Montiel-Herrera *et al.*, 2015).

Os hidrogéis podem ser sintetizados a partir de materiais naturais ou sintéticos. Em relação as vantagens e desvantagens dessas diferentes fontes, sabe-se que hidrogéis sintéticos apresentam excelentes propriedades mecânicas e hidrofílicas (Kiritoshi e Ishihara, 2004), porém sua grande desvantagem é que não apresentam propriedades bioativas, o que diminui o campo de aplicação desses materiais, principalmente nas áreas biomédicas. Por outro lado, os hidrogéis preparados a partir de polímeros naturais podem apresentar propriedades mecânicas não satisfatórias ou evocar respostas inflamatórias, porém apresentam propriedades vantajosas, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e reconhecimento de moléculas biológicas (Lin e Metters, 2007), sendo um material com grande vantagem quando o objetivo visa desenvolver biomateriais para aplicações biológicas. Como exemplos de hidrogéis provenientes de polímeros naturais podemos citar o alginato, quitosana, carboximetilcelulose, colágeno, gelatina, dextrano, amido ou ácido hialurônico e como exemplo de polímeros sintéticos o polietileno ou polímeros baseados em monômeros de acrilato (Buwalda *et al.*, 2014).

Por conta da sua alta quantidade de água, os nutrientes, proteínas, peptídeos, moléculas de oxigênio, ácido ribonucleico (RNA) e ácido desoxirribonucleico (DNA) permeiam facilmente através de hidrogéis. Além do mais, estudos demonstram que na maioria das vezes células imobilizadas em hidrogéis mantem sua função e viabilidade conferindo uma grande vantagem a esse material. Outra vantagem é que os hidrogéis podem interagir com receptores da superfície celular e matriz extracelular ordenando eventos celulares como: adesão, migração, mitose, diferenciação, maturação e expressão de proteínas (Jabbari, 2018). Além destas vantagens, os hidrogéis podem ser inseridos em organismos vivos através de métodos minimamente invasivos, evitando intervenções cirúrgicas complexas (Wu *et al.*, 2016).

Os hidrogéis podem ser desenvolvidos e apresentar-se de formas diferentes em decorrência da sua aplicação, como por exemplo, a forma sólida moldada (lentes de contato); filmes de revestimento (para liberação transdérmica de fármacos);

matrizes compactadas (comprimidos e cápsulas para administração oral); micropartículas e na forma de géis (Hoffman, 2012). Além disso, os hidrogéis podem ser utilizados também como sistemas de liberação específica de fármacos para cavidade oral, retal, ocular, transdérmica e subcutânea (Peppas *et al.*, 2000).

São diversas as aplicações e possibilidades de uso de hidrogéis poliméricos, em diversas áreas e campos de atuação, como por exemplo, na área da engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

2.7.1. Aplicações de hidrogéis na engenharia de tecidos e medicina regenerativa

Hidrogéis degradáveis compatíveis com células podem ser sintetizados com objetivo de reproduzir características físicas e bioquímicas das matrizes extracelulares (MEC) do corpo humano e sofrer degradação em condições fisiológicas. Os hidrogéis são de grande interesse para aplicações na área da saúde por conta do seu estado altamente hidratado (têm a capacidade de absorver de 10-20% até milhares de vezes do seu peso seco), que se assemelha às características dos tecidos do corpo e por responderem a fatores ambientais tais como temperatura e pH, facilitando a entrega direcionada de agentes terapêuticos (Xue *et al.*, 2011). Por possuírem essas características, estão sendo aplicados em várias áreas de bioengenharia, favorecendo a entrega controlada de moléculas bioativas, encapsulamento de células para controle de cultivo tridimensional e engenharia de tecidos (Kharkar, Kiick e Kloxin, 2013).

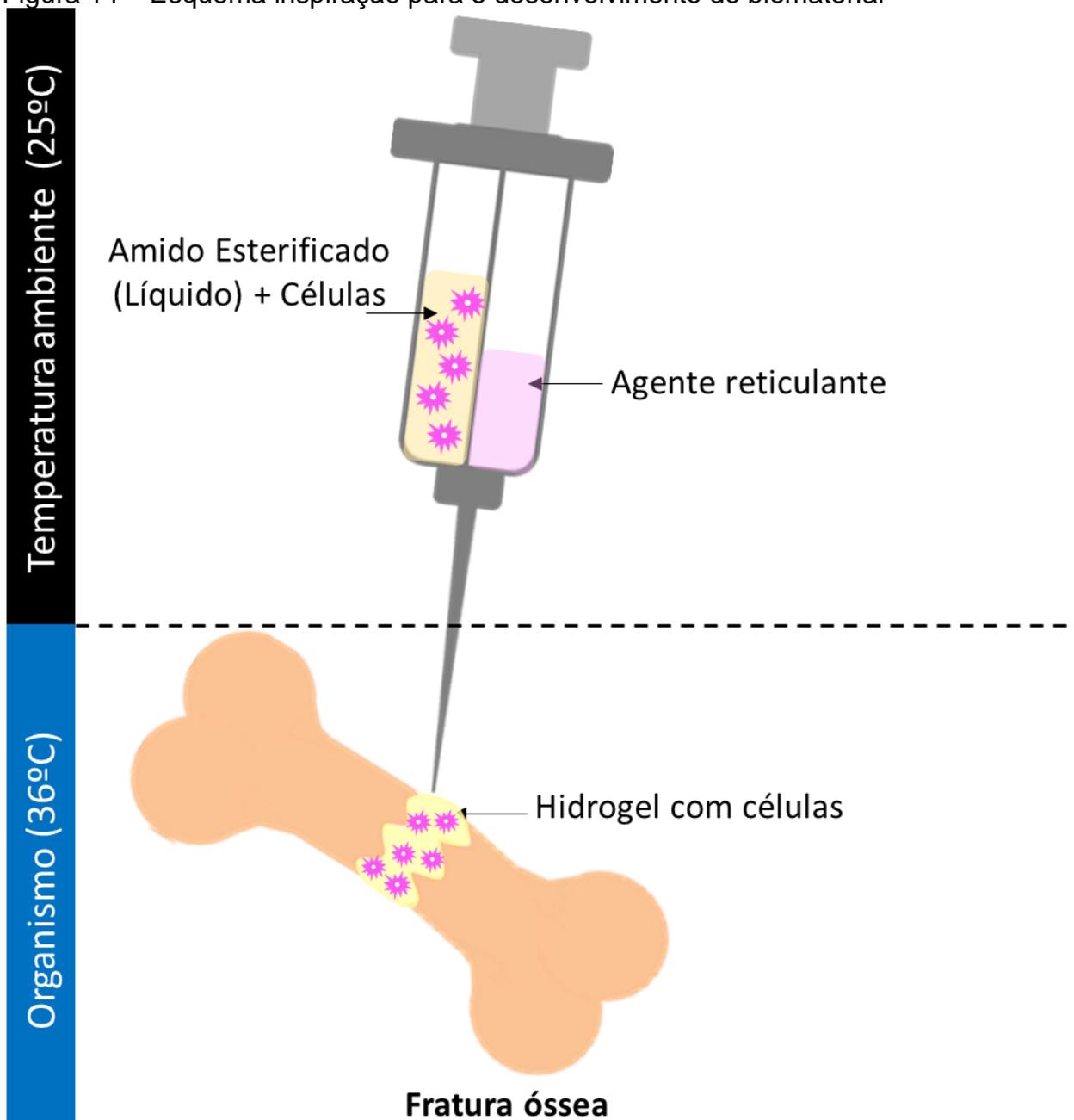
Na engenharia de tecidos, os hidrogéis, principalmente de origem natural são utilizados como, por exemplo, como carreadores de células (Jabbari, 2018). Também vem sendo usados como agentes de enchimento, como veículos para a entrega de moléculas bioativas ou como *scaffolds* para entrega de células. No campo da medicina regenerativa os hidrogéis estão sendo muito utilizados como biomateriais para entrega de células em locais onde há lesão, com o intuito de promover a substituição, reparo e regeneração tecidual (Jabbari, 2018). Estudos demonstraram que células ATDC-5 (linha celular condrogênica) encapsuladas mostraram alta viabilidade e proliferação, indicando o grande potencial dos hidrogéis ácido hialurônico-polietileno na engenharia de tecidos cartilagosos. E, além disso, hidrogéis também podem ser utilizados como sistemas de liberação para biofármacos, porque podem ser administrados por injeção, podem por exemplo, ser utilizados no carregamento de proteínas terapêuticas, sendo altamente atraentes por protegerem as

proteínas contra a degradação e fornece liberação sem danos a molécula (Gregoritza e Brandl, 2015). Além dessas, outra vantagem que tornam hidrogéis materiais interessantes para aplicações médicas é devido a sua atoxicidade, a capacidade de intumescer em água e fluídos biológicos, pois se assemelham aos tecidos biológicos; sua consistência elastomérica, que minimiza o atrito entre tecidos e o hidrogel; a alta permeabilidade, permitindo o fluxo de fluídos corpóreos pelo hidrogel devido à alta porosidade; a facilidade de obtenção em diferentes formas e permitir a incorporação e liberação controlada de fármacos de diferentes polaridades (Moura, De *et al.*, 2005). No presente estudo, devido ao grande número de trabalhos com entrega controlada de drogas em hidrogéis, buscou-se estudar a entrega celular para aplicação futura na Medicina Regenerativa.

No entanto, as abordagens existentes de hidrogéis em relação a entrega e carreamento de células mostraram sucesso limitado, com numerosos estudos mostrando menos de 5% das células injetadas persistem no local da injeção após alguns dias. Um dos principais desafios da terapia celular baseada em injeção é a necessidade de determinar protocolos de entrega para garantir precisão suficiente, melhoria da sobrevivência da célula e reprodutibilidade das células para eficácia do tratamento (Amer *et al.*, 2017). Diante do exposto, diversos estudos tem dado ênfase para hidrogéis que tem como propriedades alteração de viscosidade dependente de temperatura. Em que, por exemplo, um gel de amido a temperatura ambiente (25°C) se apresenta na forma líquida e que quando injetado em meio fisiológico (36°C) juntamente com um agente reticulante há formação de um hidrogel (com aumento de viscosidade). Esse aumento de viscosidade poderia contribuir com o aumento do tempo de liberação das células e permanência das mesmas no local da lesão.

Diante disso, esses estudos tem se tornado inspiração para realização do presente projeto de pesquisa, em que se buscou reticular o amido de milho modificado com intuito de desenvolver um novo material que possa ser introduzido através de injeção (por estar à temperatura ambiente na forma líquida, evitando assim a exposição do paciente a procedimentos cirúrgicos altamente invasivos) e que após a entrada do material no organismo (juntamente com o agente reticulante e células) ocorra a reticulação do material e dê origem a um hidrogel (Fig. 14), tendo a perspectiva futura de utilizá-lo para entrega de células e para o aumento da permanência das células no local da injeção/lesão.

Figura 14 – Esquema inspiração para o desenvolvimento do biomaterial



Fonte: Elaborada pela autora

Atualmente existem diversos estudos de engenharia de tecidos usando sistemas de formação de gel injetáveis in situ, que demonstram que em resposta à mudança de temperatura (gelificação térmica), mudança de pH, reticulação ou troca de solvente, as formulações de polímeros injetáveis podem gelificar in vivo. Essas formulações injetáveis oferecem vantagens significativas quando comparadas com *scaffolds* pré-formados. Tais vantagens são: a possibilidade de implantação com procedimentos minimamente invasivos, capacidade de preencher a forma desejada e a fácil incorporação na formulação de diversos agentes terapêuticos. Além das

vantagens, faz-se importante também salientar que inúmeros fatores precisam ser considerados antes que um gel injetável possa ser selecionado como ideal para aplicações de engenharia de tecidos, tais como: considerar as interações célula-matriz específicas do tecido, a cinética de gelificação, possível toxicidade dos produtos e suas rotas de eliminação e a possível interferência da matriz do gel com a histogênese (Gutowska, Jeong e Jasionowski, 2001).

Sistemas de formação de gel in situ são bons candidatos para veículos de entrega de células injetáveis. Como exemplo podemos citar o sistema de géis de ácido hialurônico que se formam in situ após ser injetado. As propriedades do ácido hialurônico inspiraram os pesquisadores a utilizá-lo no transporte de drogas, proteínas e entrega de peptídeos (Drobnik, 1991) e também em aplicações de engenharia de tecidos para reparo de fratura óssea e cicatrização de feridas (Goa e Benfield, 1994). Além disso, estudos demonstram que as propriedades físico-químicas do ácido hialurônico podem ser melhoradas através de reticulação química com a divinilsulfona, essa reação de reticulação produz géis hidratados e insolúveis, os chamados polímeros de hialano. Estudos realizados em animais demonstraram que esses polímeros de hialano são atóxicos, não antigênicos, não inflamatórios e não provocam reação de corpo estranho (Hallén, Johansson e Laurent, 1999).

Atualmente já existem produtos à base de ácido hialurônico sendo utilizado no mercado para aplicação na engenharia de tecidos, porém sem a presença de células. Um exemplo é o "Osteonil[®]", produto utilizado para o tratamento de distúrbios degenerativos e traumáticos das articulações e tendões. É uma solução de ácido hialurônico de sódio (contém o sal sódico do ácido hialurônico), administrado uma vez por semana por via intra-articular e seu ciclo de tratamento varia de duas a cinco semanas. A substância ativa de ácido hialurônico de sódio é uma fração obtida do ácido hialurônico com elevado grau de pureza através de filtração molecular a partir de material biológico. Diversos estudos tem demonstrado a eficácia desse material através da administração injetável. Estudo controlado, randomizado e multicêntrico, verificou a eficácia da aplicação intra-articulares durante 5 semanas de ácido hialurônico de sódio 20 mg e comprovou o alívio da dor em pacientes com osteoartrite de joelho (Altman e Moskowitz, 1998). Além disso, confirmou-se em estudos que a administração intra-articular de 3 a 5 injeções de ácido hialurônico de sódio 20 mg além ter sido eficaz no tratamento de osteoartrite de joelho, foi também duradoura, produzindo efeito terapêutico persistente durante 60 dias de acompanhamento

(Carrabba *et al.*, 1995). Essas pesquisas e resultados tem inspirado o presente trabalho na busca de novos materiais com características inovadoras a base de polímeros naturais, através da administração injetável.

Como citado anteriormente já existem diversos hidrogéis utilizados na medicina, podendo ser ou não preparados por reações *click chemistry*. Em relação aos hidrogéis desenvolvidos por reações *click chemistry* podemos citar um estudo realizado para síntese de hidrogel injetável a base de ácido hialurônico, que demonstrou ser excelente protetor celular e possuir boa biocompatibilidade em testes *in vitro* e *in vivo* em camundongos, possuindo grande potencial para aplicações biomédicas, como por exemplo entrega de células. Esse hidrogel injetável foi desenvolvido através de reticulação por reação de click de tiol-eno (Cao *et al.*, 2019). Outro estudo via reação tiol-eno foi realizado para o desenvolvimento de hidrogéis de polietileno glicol degradáveis enzimaticamente e resultou que a reação de reticulação não afetou significativamente a viabilidade de células tronco mesenquimais encapsuladas (Kharkar, Kiick e Kloxin, 2013). Outro estudo usando polietileno glicol funcionalizado com maleimida e peptídeos foi realizado para a síntese de hidrogéis e, o estudo resultou que esses hidrogéis mantiveram a viabilidade celular e promoveram a liberação de células encapsuladas (Phelps *et al.*, 2012). Vale ressaltar que o grande diferencial do presente projeto em relação a esses citados anteriormente é a utilização da reação de *click chemistry* via DA. Apesar das escassas literaturas descritas um dos trabalhos encontrados na literatura que se assemelha ao nosso foi desenvolvido utilizando o ácido hialurônico. Os pesquisadores demonstram que hidrogéis de ácido hialurônico-furano e bismaleimida foram sintetizados via reação química de DA, porém como resultados obtiveram que não foi possível o encapsulamento de células viáveis. Em outro estudo para melhoria dos resultados, a cinética da reação foi acelerada pela substituição do ácido hialurônico-furano pelo ácido hialurônico-metilfurano mais rico em elétrons e, esse novo hidrogel reticulado resultou em gelificação mais rápida e em pH fisiológico, permitindo o encapsulamento de células viáveis, sendo essa novo hidrogel um possível material para uso em cultura de células 3D e engenharia de tecidos (Smith *et al.*, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

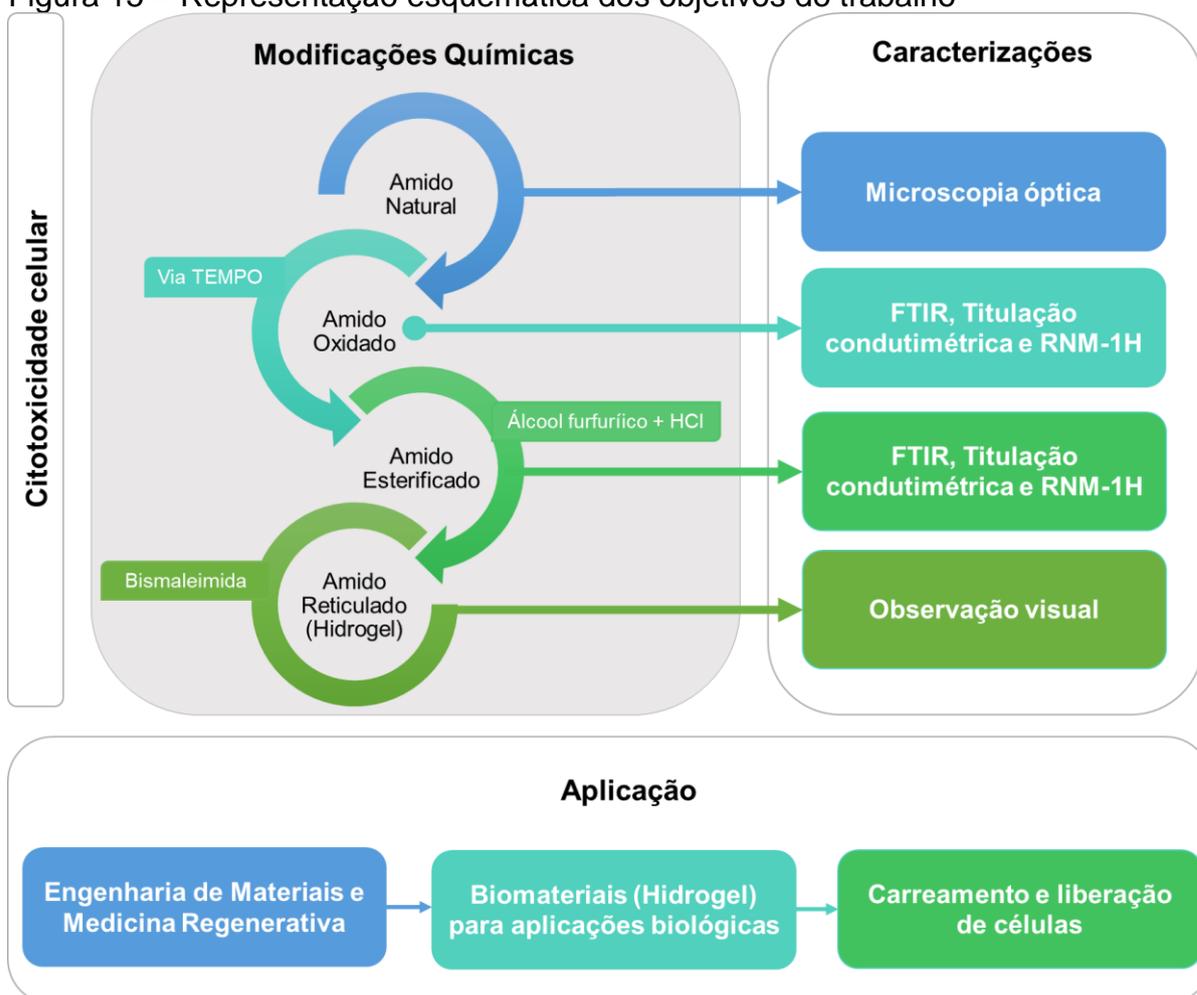
Desenvolver um biomaterial que tenha característica de ser líquido a temperatura ambiente (25°C), para que possa ser administrado através de injeção e que posteriormente seja reticulado à temperatura corporal (36/40°C), originando um hidrogel.

3.2. Objetivos específicos

- a) Realizar modificações químicas na molécula do amido de milho, através de reações de oxidação, esterificação e reticulação por Diels-Alder;
- b) Identificar métodos precisos de purificação dos materiais para retirada do excesso de reagentes ao final das reações químicas de oxidação e esterificação;
- c) Investigar através de FTIR, RNM-1H e titulação condutimétrica a caracterização química dos materiais;
- d) Comparar através de observações visuais, alterações na viscosidade da amostra antes e após reticulação;
- e) Demonstrar através de ensaio de citotoxicidade celular a porcentagem de células viáveis nas amostras antes e após modificações químicas, bem como, a citotoxicidade dos reagentes utilizados nas reações.

A Figura 15 demonstra os objetivos geral e específicos do trabalho de forma esquemática.

Figura 15 – Representação esquemática dos objetivos do trabalho



Fonte: Elaborada pela autora.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Amido de milho (Unilever); vidrarias laboratoriais (béquer, pipeta, balão volumétrico, balão de fundo redondo, condensador, placa de Petri, vidro de relógio, tubo Falcon e tubo de ensaio); reagentes brometo de sódio (NaBr), N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO), hidróxido de sódio (NaOH), álcool etílico absoluto PA, álcool furfurílico, ácido clorídrico (HCl), água deuterada (D₂O), água destilada, bismaleimida (Montiel-Herrera *et al.*, 2015)); pipeta automática; Equipamentos (espectrômetro Perkin Elmer Spectrum, espectrômetro de RMN BrukerBioSpin, placa aquecedora, agitador magnético, pHmetro, condutivímetro, estufa, balança analítica e centrífuga).

4.2. Gelatinização do amido de milho

Foram pesados na balança analítica (Bel engineering) 20g do amido de milho, adicionou-se 625mL de água destilada e aqueceu-se em placa aquecedora (Corning PC-420D) a 80°C (temperatura ótima de gelatinização) sob agitação magnética (Corning PC-420D) a 1.000 rpm, durante 1 hora e 40 minutos, até a formação de gel de amido. Em seguida, resfriou em temperatura ambiente durante 24 horas e realizou-se análise em microscópio óptico (100x) a fim de verificar a quebra dos grãos.

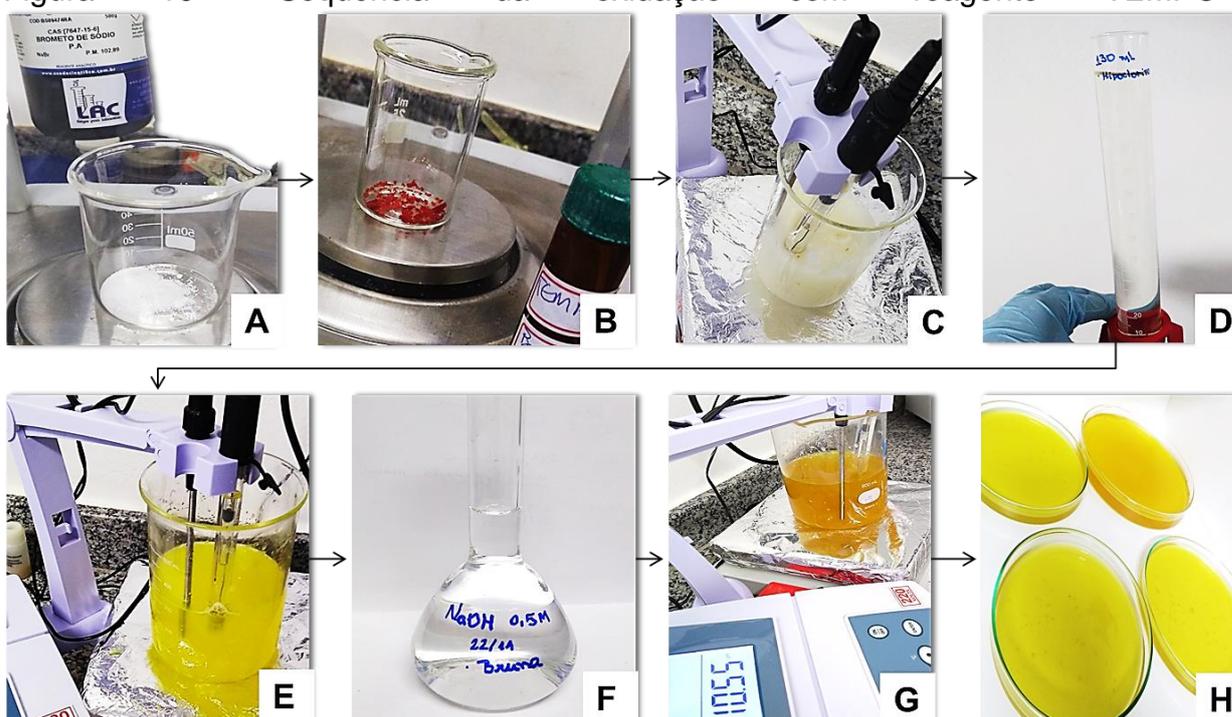
4.3. Oxidação do amido

O amido geleificado foi oxidado com o reagente TEMPO seguindo metodologia convencional (Kato, Matsuo e Isogai, 2003) para dar origem a grupamentos carboxílicos pendentes em sua estrutura. A reação ocorre transformando a hidroxila (OH) do amido em ácido carboxílico (COOH) para posterior reação de esterificação.

Para isso, pesou-se metade do gel de amido desenvolvido na etapa anterior (corresponde a 10g do amido sólido). Sob agitação magnética, adicionou 1,25g de brometo de sódio (NaBr) previamente dissolvido em algumas gotas de água destilada (aproximadamente 50µL) e 0,125g do reagente TEMPO previamente dissolvido em algumas gotas de água destilada. Com auxílio do pHmetro calibrado da marca Bel

modelo W3B analisou-se a mudança do pH, ao gotejar com auxílio de conta gotas 130mL de hipoclorito (2,5%) até o pH ficar em torno de 9,5 a 10,5. Em seguida, gotejou-se hidróxido de sódio (NaOH) 0,5M até que o pH estabilizasse em torno de 10,5. Armazenou-se em placas de Petri para secagem em temperatura ambiente (25°C) durante 15 dias (Fig. 16). Após a oxidação, realizou-se a separação por precipitação do material.

Figura 16– Sequência da oxidação com reagente TEMPO



Fonte: Elaborada pela autora.

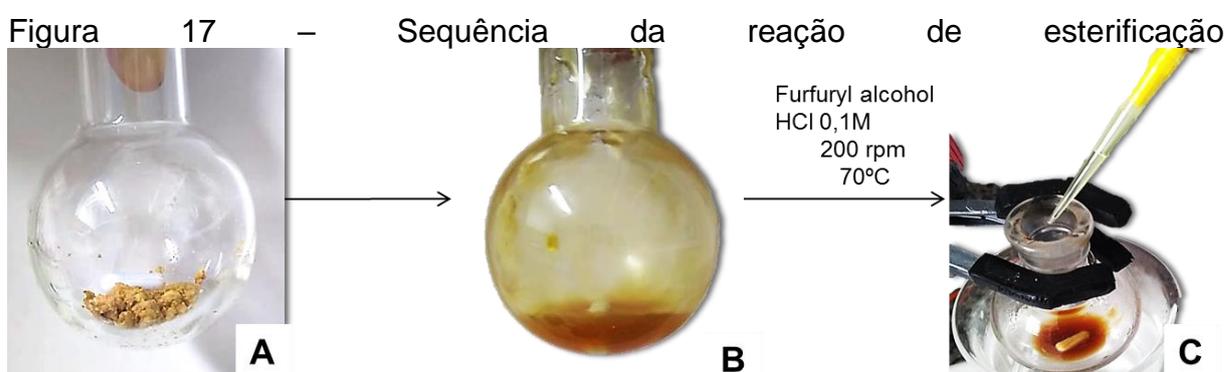
Legenda: A - Brometo de sódio; B - Reagente TEMPO; C - Gel de amido natural; D - Hipoclorito 2,5%; E - Adição hipoclorito amostra amido; F - NaOH; G - Adição de NaOH na amostra de amido; H - Secagem a temperatura ambiente 25°C.

4.4. Separação por precipitação

Após a oxidação, realizou-se a separação por precipitação do material a fim de retirar as impurezas provenientes da reação (reagentes e sal) e realizar a separação do material. Para isso adicionou-se 20mL de água destilada na amostra para dissolver o sal formado pela reação anterior e em seguida adicionou-se 50mL de álcool etílico absoluto PA para precipitação do amido. A amostra permaneceu em repouso para sedimentação durante 10 horas e descartou cuidadosamente o sobrenadante, com auxílio de uma pipeta. Em seguida, secou o sedimentado em estufa a 50°C durante que 3 horas.

4.5. Reação de esterificação – Inserção grupamentos furanos

Adicionou-se 1,0g do amido oxidado em um balão de fundo redondo. Em seguida, adicionou-se algumas gotas de água destilada (aproximadamente 50 μ L) até o amido oxidado dissolver-se virando um líquido viscoso. Adicionou-se 200 μ L de álcool furfurílico e 60 μ L de ácido clorídrico (HCl) 0,1M como catalisador sob agitação magnética a 200 rpm e em banho maria a 70°C, em sistema fechado, durante 8 horas. Em seguida, resfriou-se a temperatura ambiente (25°C) durante 12 horas (Fig. 17).



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: A - Amido oxidado; B - Adição água destilada; C - Adição álcool furfurílico e catalisador (HCl) para reação de esterificação.

Em seguida para purificação do material e retirada do excesso de reagentes que possam interferir nas reações químicas futuras, adicionou-se 200 μ L da amostra esterificada em um vidro de relógio e lavou com 200 μ L de etanol 5 vezes. Transferiu-se a amostra para um béquer e adicionou-se 1mL de água destilada. Em seguida, transferiu-se a amostra para um Tubo falcon contendo 10 mL de etanol gelado e centrifugou-se a 2.000 rpm por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. O procedimento foi repetido por três vezes. Em seguida secou-se o precipitado em temperatura ambiente (25°C) durante 3 horas. Anotou-se as massas (inicial e final) para cálculo do rendimento (η) (Eq. 1) e, em seguida, armazenou-se o material a temperatura ambiente (25°C) para as análises de caracterização química e viabilidade celular.

$$\eta = (MF \times 100) / Mi$$

Equação 1. Cálculo do Rendimento (η).

Sendo:

η = rendimento (%)

MF = Massa Final (g)

Mi = Massa Inicial (g)

4.6. Caracterização química – etapas de oxidação e esterificação

Para confirmação da efetividade da oxidação, separação por precipitação e esterificação realizou-se as caracterizações químicas do material por FTIR (com acessório ATR) em um espectômetro Perkin Elmer Spectrum 100 a 4 cm^{-1} de resolução com 16 varreduras na faixa de 4.000 a 600 cm^{-1} . E 1H-RMN adquiridos em um Espectrômetro de RMN BrukerBioSpin operando a 300MHz, com água deuterada ($^2\text{H}_2\text{O}$ ou D_2O) como solvente. Posteriormente, determinou-se o número dos grupamentos carboxílicos por titulação condutimétrica convencional utilizando uma solução de NaOH (0.1 M) como titulante.

Para isso adicionou-se $50\mu\text{L}$ das amostras de amido (natural, oxidada e esterificada), homogeneizou por 5 minutos a 100 rpm e ajustou o pH (pHmetro Sensoglass) para 2,5 utilizando HCl 0,1M. Em seguida, titulou-se (condutivímetro Sensoglass) com NaOH 0,1M, $200\mu\text{L}$ de NaOH em intervalos de 20 segundos sob agitação magnética a 380 rpm (Figura 18), anotou-se os resultados para realização dos cálculos para quantificação dos grupamentos carboxílicos nas amostras (Eq. 2).

$$X = [C \cdot (v_2 - v_1)] / w$$

Equação 2. Quantificação dos grupamentos carboxílicos

Sendo:

C = concentração do titulante = 0,1M

W = massa da amostra = 0,1g

V1 e V2 = volumes equivalentes em L

Figura 18 – Titulação condutimétrica amostras amido

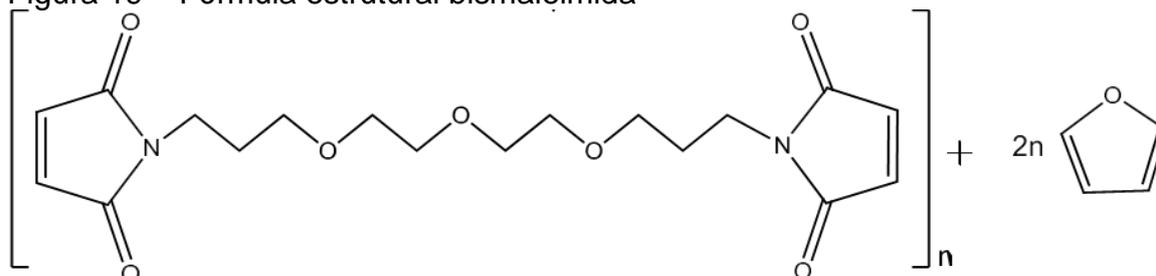


Fonte: Arquivo pessoal.

4.7. Reticulação furano-bismaleimida por reação de DA

O amido oxidado e esterificado foi reticulado na presença de uma bismaleimida, através da reação de DA. A bismaleimida agindo como dienófilo, como agente de ligação cruzada. Um ponto importante a ser ressaltado em relação a molécula de bismaleimida, é que ela apresenta diferentes propriedades e estas dependem diretamente dos reagentes e métodos utilizados para síntese da bismaleimida. No presente trabalho, utilizou-se bismaleimida a base de *exo*-3,6-epoxi-1,2,3,6-tetrahidroftálico anidrido (ETHPA) e 10-trioxa-1,13-tridecanodiamina (TTDDA), que tem como característica significativa ser solúvel em água. A bismaleimida (Fig. 19) utilizada no trabalho de pesquisa foi obtida através da síntese e caracterização prévia em trabalho de Doutorado por Ricardo Klaus Kramer e colaboradores (Kramer *et al.*, 2019). Em seguida para reticulação do material, o seguinte método foi realizado.

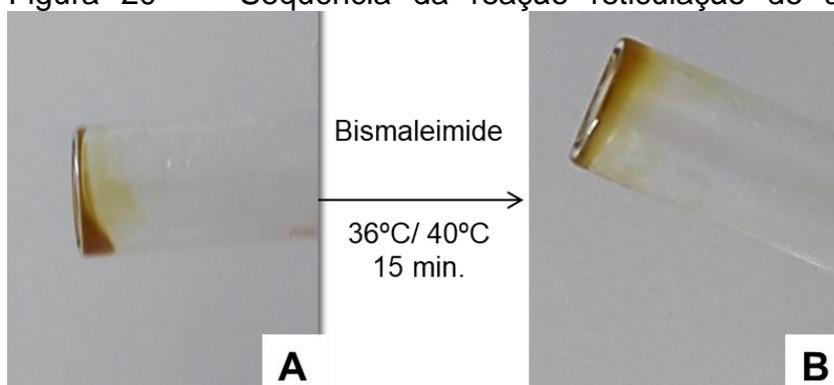
Figura 19 – Fórmula estrutural bismaleimida



Fonte: Kramer *et al.*, 2019, p. 53.

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 0,0174g do amido esterificado previamente nas etapas anteriores, correspondente a 0,017mmol de furano. Em seguida, adicionou-se 50µL de água destilada, sob aquecimento em banho maria a 80°C até o material ficar levemente viscoso. Adicionou-se 0,0010g de bismaleimida, correspondente a 0,0085 mmol, na proporção de (2:1) sendo 2 furanos para 1 bismaleimida. Conservou-se sob aquecimento em banho maria a 40°C, durante 15 minutos sob leve agitação (Fig. 20). Em seguida, para confirmação da técnica foram realizadas a observação visual da viscosidade da amostra.

Figura 20 – Sequência da reação reticulação do amido por reação de DA



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: A – Amido esterificado; B – Adição de bismaleimida para reticulação furano-bismaleimida 2:1.

4.8. Ensaio de citotoxicidade celular

O material foi submetido ao primeiro estágio de avaliação de citotoxicidade de extrato líquido *in vitro* de acordo com a norma ISO 10993-5:2009 (*Biological evaluation of medical devices; Part 5: tests for in vitro cytotoxicity*) que determina que amostras que reduzem a viabilidade celular para valores inferiores a 70% devem ser considerados citotóxicos e, amostras com viabilidade acima de 70% são consideradas viáveis. A análise de viabilidade celular corresponde a ferramentas que qualificam e/ou quantificam células viáveis, ou seja, células metabolicamente ativas em uma cultura. Em conformidade com a ISO todas as amostras foram testadas em triplicata.

Células da linhagem de fibroblastos humanos (GM07492) foram utilizadas para avaliar os efeitos das amostras sobre sua viabilidade. Para esse teste foram preparados extratos líquidos de 10mg/mL em meio Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100U/mL; estreptomicina 0,1mg/mL) e mantidos a 37°C por 24 horas. Após esse período realizou-se uma diluição seriada a partir da concentração de 10 mg/mL até

0,005 mg/mL As culturas foram mantidas a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ em atmosfera de 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico por 24h.

Um volume de 100 μL do extrato foi colocado em placas de cultura de células contendo 1×10^4 células por poço. As placas foram mantidas em incubadora de cultura de células (Panasonic- CO_2 incubadora moc-19 aic-uv) a 37°C , atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar por 24h. A viabilidade celular foi então determinada utilizando o método Brometo de [3-(4,5- dimetiltiazol 2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT) que tem como princípio ser um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular.

Em seguida, o meio de cultura foi removido dos poços, os quais foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (1x PBS). Alíquotas de 50 μL de MTT foram adicionadas a cada poço e as células foram mantidas em condições de cultura por 4h. Após este período, foram adicionados 100 μL de álcool isopropílico e o conteúdo do poço foi homogeneizado mecanicamente até a solubilização completa do formazan. Os valores de densidade óptica de absorbância (od) foram obtidos em espectrofotômetro (Polaris-celer) a 570 nm. Para a realização do experimento foi utilizado um controle positivo (citotóxico - DMSO 70% em meio de cultura DMEM) e controle negativo (não citotóxico - meio de cultura DMEM), a porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle negativo, segundo a equação (Eq. 3):

$$\% \text{ de células viáveis} = \left(\frac{\text{Abs. da amostra teste}}{\text{Abs. do controle negativo}} \right) \times 100$$

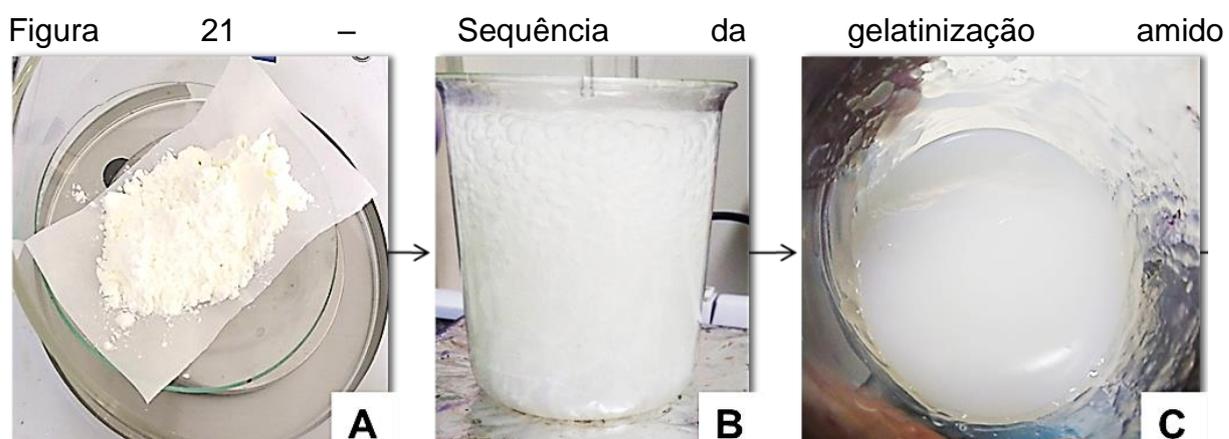
Equação 3. Porcentagem de células viáveis.

O IC_{50} , que representa a concentração requerida capaz de inibir 50% do crescimento celular, foi calculado através do software GrandPrism 7 de acordo com U.S. Food and Drug Administration (FDA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Resultados etapa de gelatinização do amido – MO

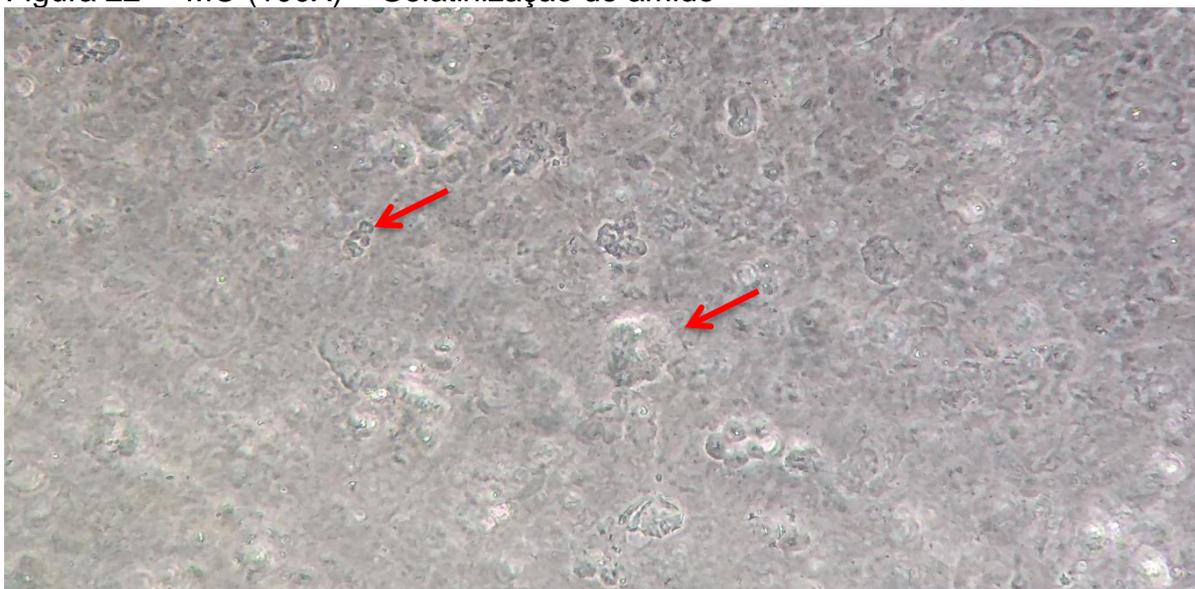
A etapa de gelatinização do amido foi realizada e observou-se visualmente a amostra de amido converter-se em aspecto de gel (Figura 21), além disso, houve a confirmação da gelatinização através da quebra dos grãos de amido, observados em MO (Figura 22). Porém foi possível observar que a ruptura não atinge uniformemente todos os grânulos de amido, corroborando com a literatura, pois quando os grânulos foram expostos a diversas temperaturas e excesso de água, os autores concluem que alguns grânulos gelatinizam parcial ou completamente durante o processo, enquanto em alguns grânulos ocorre dano morfológico/físico mínimo, mas com graus variados de modificações estruturais internas (Figura 23) (Ratnayake, Wassinger e Jackson, 2007).



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: A - Grãos amido natural; B - Adição água destilada sob aquecimento 80°C; C - Formação de Gel de amido.

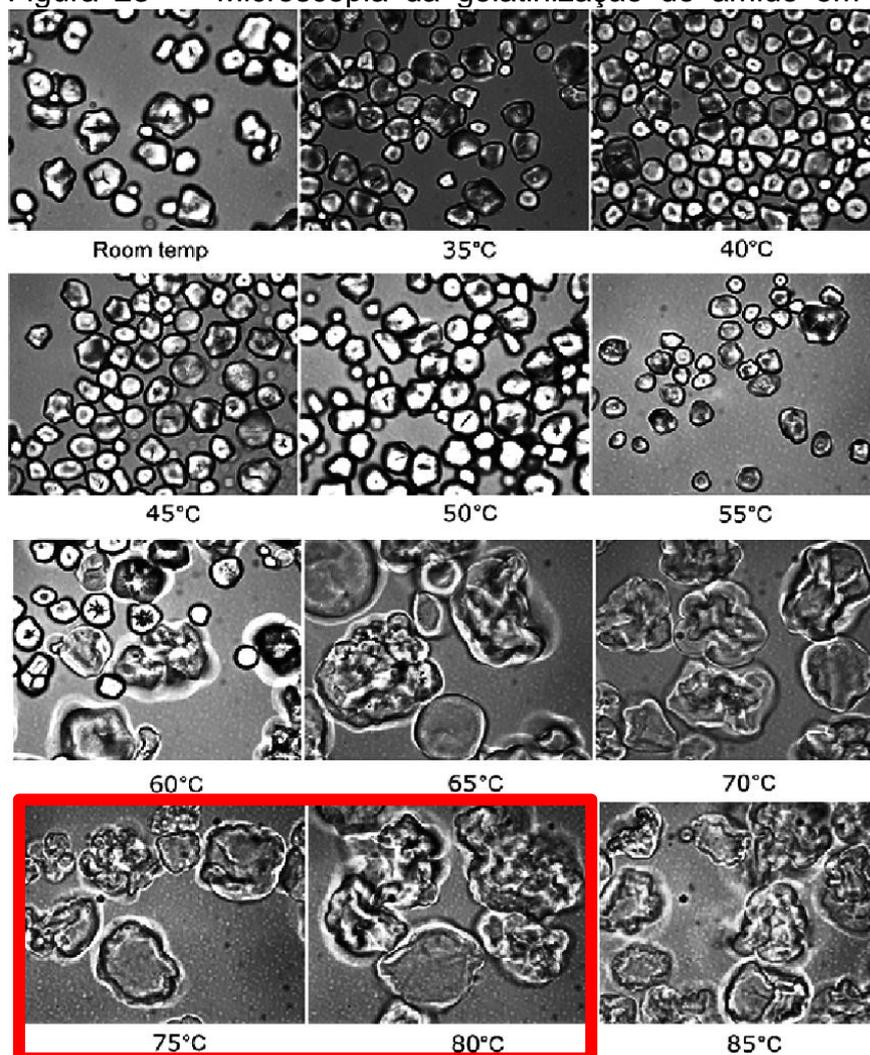
Figura 22 – MO (100X) – Gelatinização do amido



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Seta vermelha: Grânulos do amido em graus variados de modificações estruturais.

Figura 23 – Microscopia da gelatinização do amido em diferentes temperaturas



Fonte: Adaptada de (Ratnayake, Wassinger e Jackson, 2007).

5.2. Rendimento (η)

Foi realizado o cálculo de Rendimento (η) no amido esterificado (Eq. 1) utilizando a massa inicial (antes da purificação) e a massa final (após completa purificação do material). Que resultou em $\eta = 49,29\%$.

5.3. Caracterizações das etapas oxidação e esterificação

O sucesso das reações de oxidação e esterificação, foram confirmadas através das caracterizações utilizando FTIR (qualitativo), titulação condutimétrica (quantitativo) e RNM-1H.

5.3.1. Eletroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

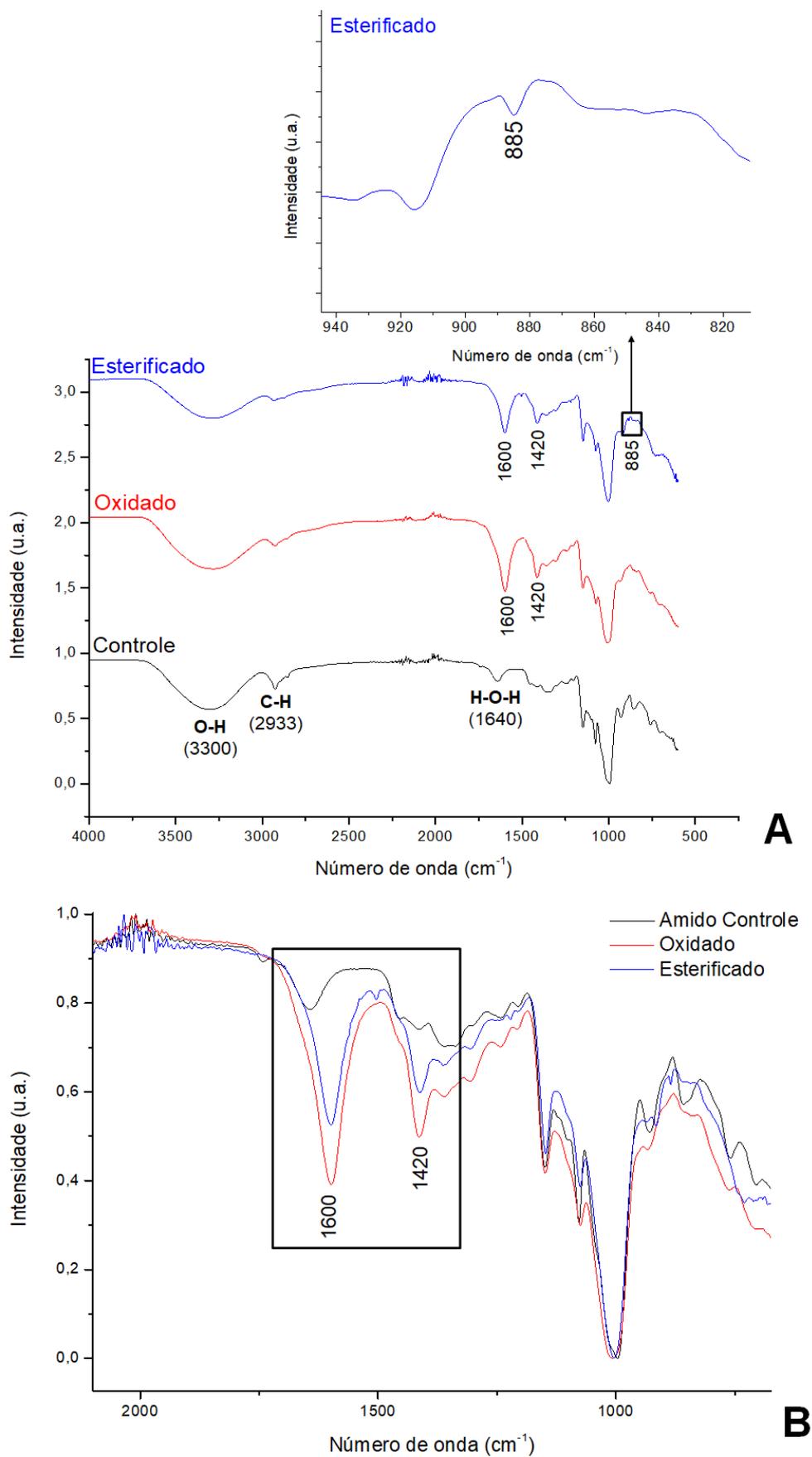
A análise do FTIR consiste em um método simples e prático na identificação dos principais grupos funcionais, sendo possível uma proposição das estruturas de substâncias orgânicas, sendo uma análise qualitativa (Lopes e Fascio, 2004).

Os espectros FTIR das amostras de amido na região de 4.000 a 600 cm^{-1} são apresentados na Figura 24. As bandas características do amido de milho nativo/controle aparecem para O-H (3300 cm^{-1}), C-H (2933 cm^{-1}) e H-O-H (1640 cm^{-1}), sendo esses resultados semelhante aos relatados anteriormente em literaturas (Bourtoom e Chinnan, 2008; Ji, Lin e Yu, 2020; Mathew, Brahmakumar e Abraham, 2006). Através da análise das amostras foi possível observar que na amostra de amido controle (não modificado), houve presença típica da banda em 1640 cm^{-1} corresponde a água fortemente ligada, presente no amido devido à sua natureza higroscópica (região amorfa) (Pozo et al., 2018; Soest, van et al., 1995). E que em comparação com a amostra de amido oxidado, houve o desaparecimento dessa banda (1640 cm^{-1}) e, o aparecimento de duas novas bandas, em 1600 cm^{-1} (Homma *et al.*, 2013) e 1420 cm^{-1} (Wu *et al.*, 2013), sendo esses correspondentes a vibrações de grupos carboxilatos assimétrico e simétrico respectivamente (Ji, Lin e Yu, 2020). A literatura descreve que aparecimento desses sinais no espectro de amidos oxidados demonstram que reação resultou na formação de grupos carboxila (Hao *et al.*, 2016). Além disso, é possível comparar os dados obtidos com a literatura (Fig. 25, Ji, Lin e Yu, 2020), em que foi realizado o FTIR do amido natural e oxidado com reagente

TEMPO e os resultados da presente pesquisa, corroboram com os resultados da literatura, confirmando sucesso na reação de oxidação.

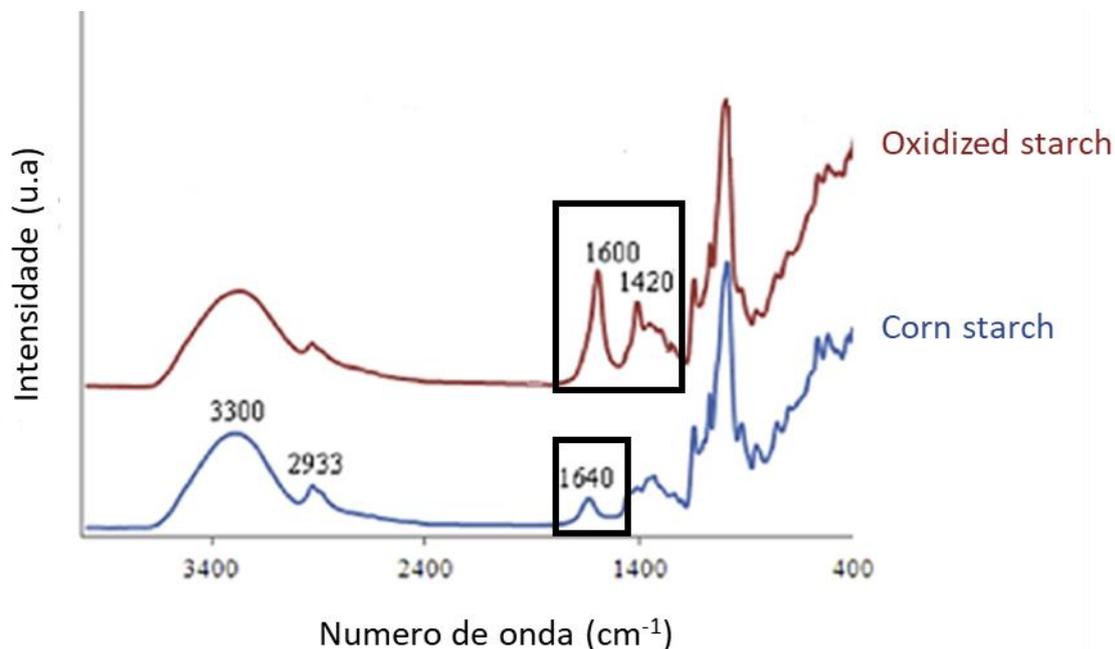
Além disso, na amostra de amido esterificado, foi possível observar que houve diminuição da intensidade da banda de 1600 e 1420 cm^{-1} (C=O) em comparação com a amostra de amido oxidado (Fig. 24B), sendo sugestivo de diminuição de COOH e, além disso, há aparecimento da banda em 885 cm^{-1} correspondentes aos anéis furânicos, sendo sugestivo da substituição de COOH em furano, indicando que a reação de esterificação ocorreu. Para confirmação dos resultados foi realizado a titulação condutimétrica (análise quantitativa).

Figura 24 – FTIR das amostras de amido



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 25 – Comparação literatura FTIR de amido natural e oxidado TEMPO

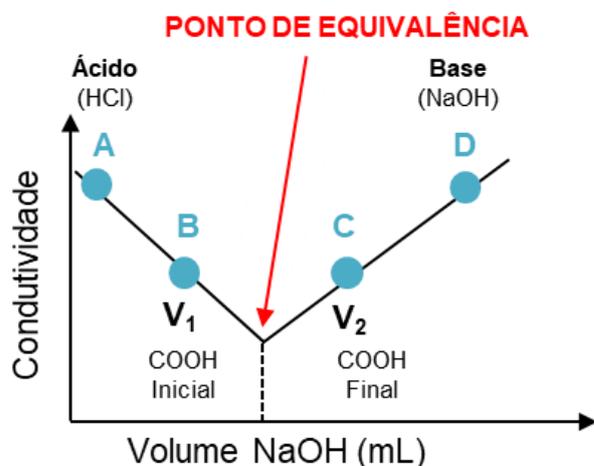


Fonte: Adaptado de Ji, Lin e Yu, 2020.

5.3.2. Titulação condutimétrica

A titulação condutimétrica fornece informação quantitativa da presença de íons presentes na amostra. As curvas são traçadas através da condutância em função do volume do titulante adicionado. As curvas consistem em regiões lineares antes e depois do ponto final. As duas partes lineares são extrapoladas para seus pontos de intersecção no ponto final. Assim como em outras titulações, o ponto final do volume é usado para calcular a quantidade ou a concentração da análise que foi inicialmente apresentado. Titulação de base forte/ácido forte, a dependência da condutância da solução com o volume do ácido (V), adicionado à base, é esquematizada na Figura 26. A parte descendente representa a variação da condutância quando há excesso de base, já a parte ascendente mostra a variação da condutância quando há excesso de ácido. A intersecção das duas retas ocorre no ponto de equivalência, é possível determinar este ponto pela medição da condutância, das soluções por exemplos, utilizados 4 pontos A, B, C e D afastados, e em seguida fazendo uma extrapolação conveniente das retas da titulação (Assumpção et al., 2008).

Figura 26 – Titulação condutimétrica

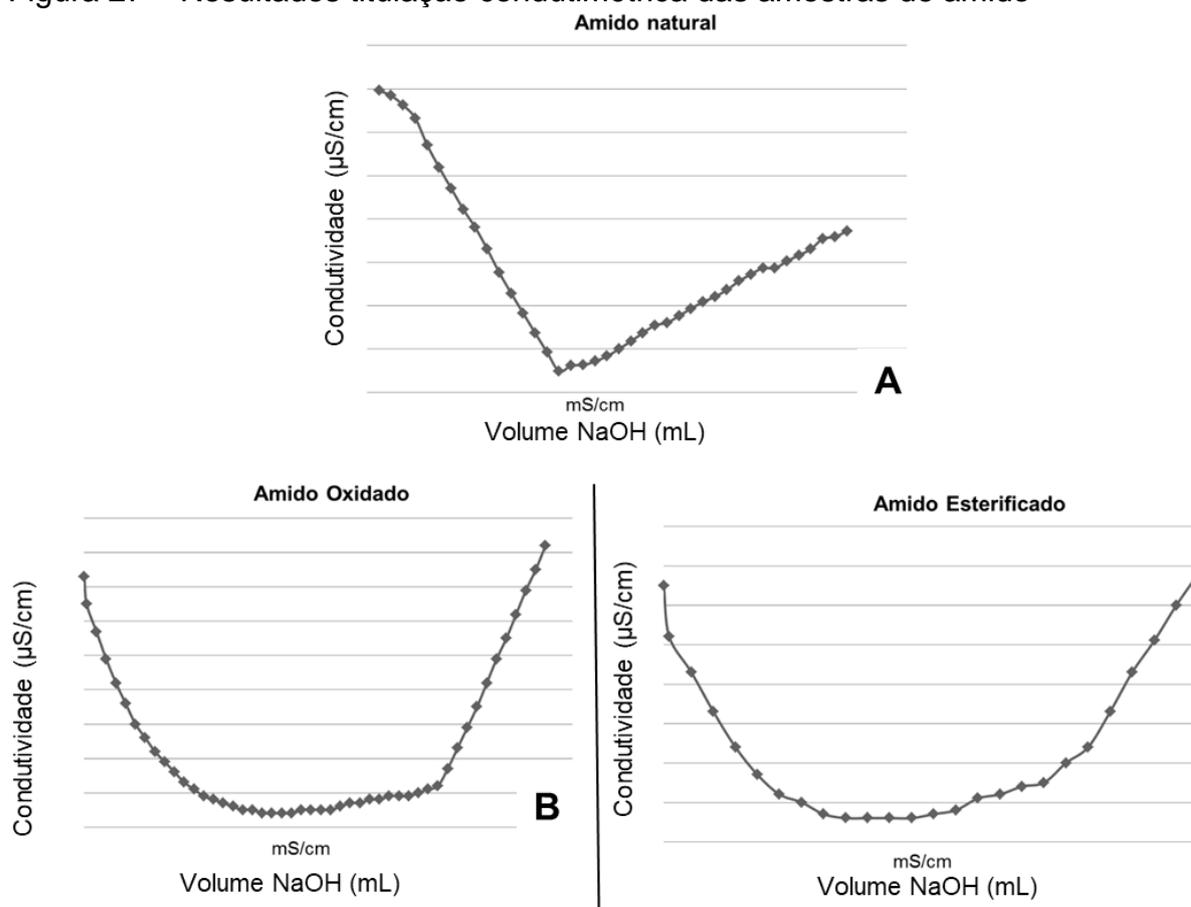


Fonte: Elaborada pela autora.

A quantidade de grupamentos carboxílicos dos materiais (amido natural, oxidado e esterificado) foi determinada por meio de titulação condutimétrica ácido/base (Fig. 27). A partir da análise gráfica é possível visualizar que na amostra de amido natural, não há presença de COOH, uma vez que não há V_1 e V_2 , o que é esperado uma vez que na molécula de amido antes das modificações não há grupamentos carboxílicos (COOH). Já na amostra de amido oxidado, há grupamentos carboxílicos, o que era esperado uma vez que a etapa de modificação do amido por oxidação substitui hidroxilas (OH) por ácido carboxílico (COOH), tendo então sucesso na modificação. Além disso, no amido oxidado há maior quantidade de COOH em comparação com a amostra de amido após reação de esterificação. Sugere-se que houve substituição do COOH por grupamentos furânicos, tendo então sucesso nas modificações.

Para confirmação da análise gráfica, foi realizado o cálculo (Eq. 2) utilizando o volume gasto de titulante (NaOH 0.1M). A partir desse dado foi possível determinar a quantidade de COOH que foi substituída por grupamentos furânicos. Foi determinado para o amido oxidado e esterificado respectivamente 1,60 mmols/g e 1,39 mmols/g, sendo possível determinar que o grau de substituição foi aproximadamente de 0,39 mmols/g, correspondendo a uma substituição de 13%.

Figura 27 – Resultados titulação condutimétrica das amostras de amido



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: A – Amido natural; B – Amido oxidado; C – Amido esterificado.

5.3.3. Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN-1H)

O RMN-1H é uma técnica analítica na qual um núcleo absorve a radiação eletromagnética de uma frequência específica, na presença de um forte campo magnético. A análise do espectro de RMN-1H permite que se determine a fórmula molecular, estrutural e até espacial da substância.

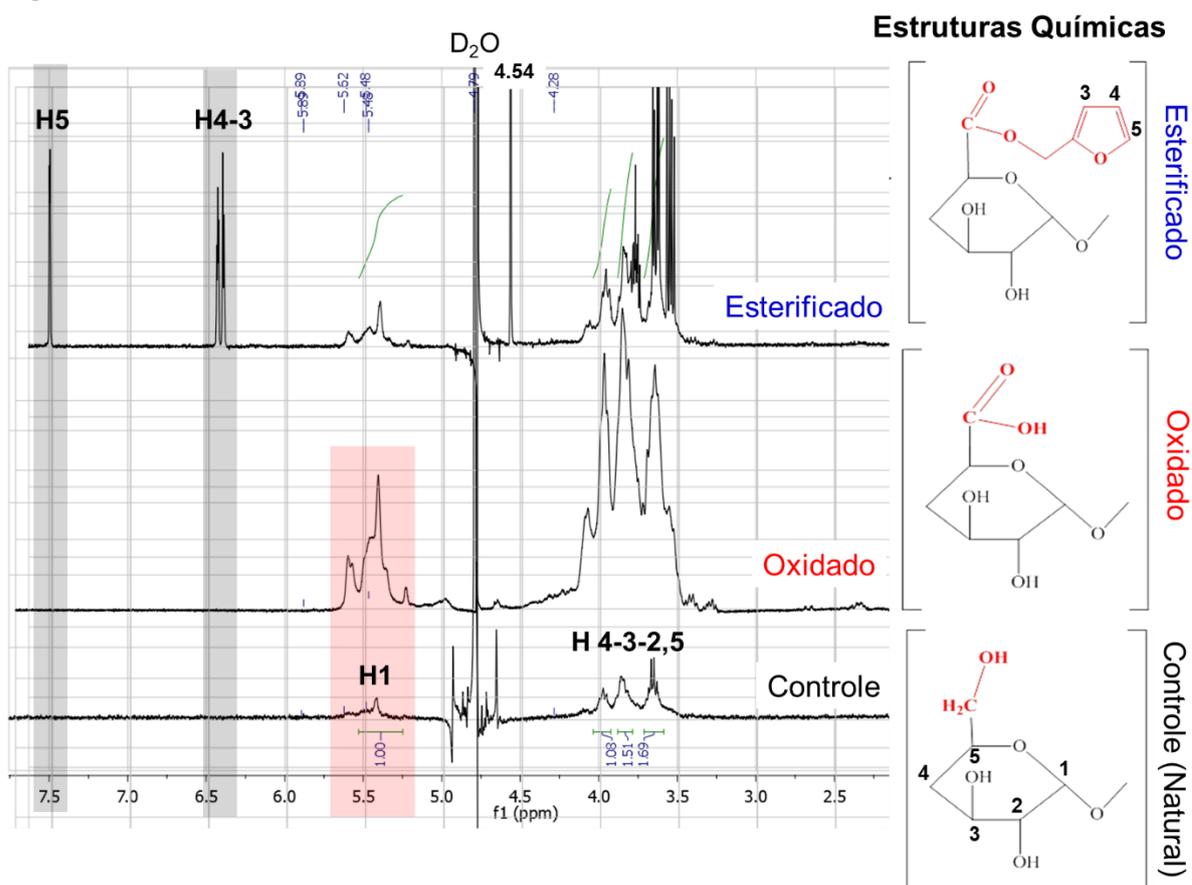
De acordo com a análise de RNM-1H das amostras (Fig. 28), os prótons característicos do amido natural (controle) aparecem na posição 5.42 ppm e corresponde ao próton H1 conforme indicado na estrutura química. Já na amostra de amido oxidado, os prótons aparecem nas posições 5.42; 5.48 e 5.61 ppm indicando a presença de ácidos carboxílicos provenientes da reação de oxidação. Além disso, é possível comparar os dados obtidos com a literatura (Fig. 29) no qual foi realizado o RNM-1H do amido natural e oxidado com reagente TEMPO (Hao et al., 2016) e os

resultados da presente pesquisa, corroboram com os resultados da literatura, confirmando sucesso na reação de oxidação.

Na amostra de amido esterificado, é possível afirmar que os prótons que aparecem nas posições 7.4; 6.2 e 6.4 ppm correspondem aos prótons H5, H4 e H3 do furano conforme ilustrado na estrutura química (Fig. 28). Além disso, quando comparado com a literatura, é possível analisar através da Figura 30 que o próton H5 (7.4 ppm) e os prótons furano H3 + H4 (6.2–6.4 ppm) são claramente visíveis nas mesmas posições, confirmando a presença de furanos na estrutura de amido esterificado (Trovatti et al., 2015).

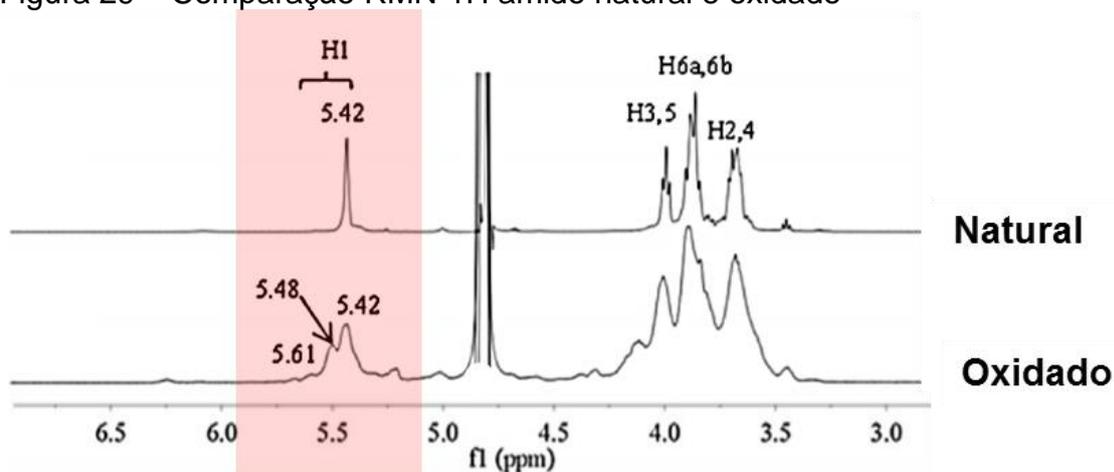
Ainda com base na literatura (Fig. 31) do RNM-1H do álcool furfurílico puro, foi possível analisar que na amostra de amido esterificado houve um excesso de reagente na reação, observado em 4.54 ppm, sendo importante uma etapa de purificação mais eficiente.

Figura 28 – RMN-1H resultado das amostras de amido



Fonte: Elaborada pela autora.

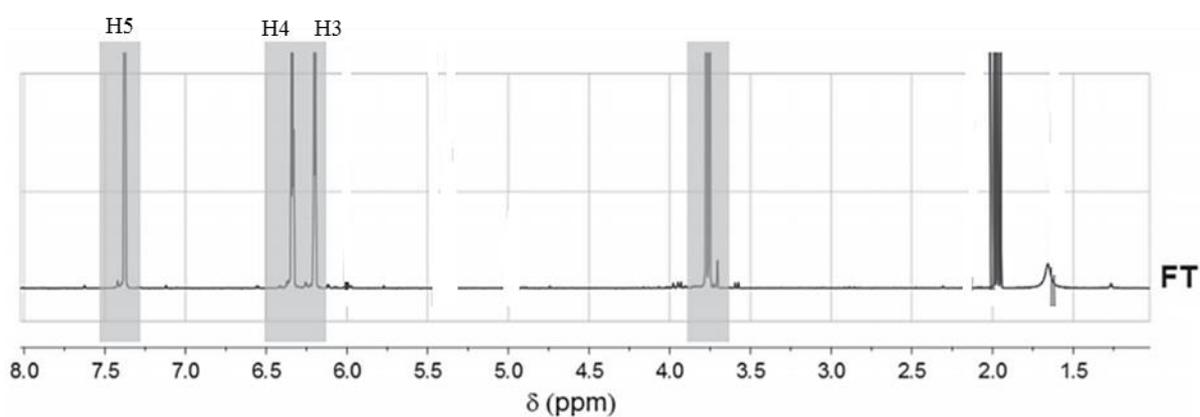
Figura 29 – Comparação RMN-1H amido natural e oxidado



Fonte: Adaptado de Hao et al., 2016.

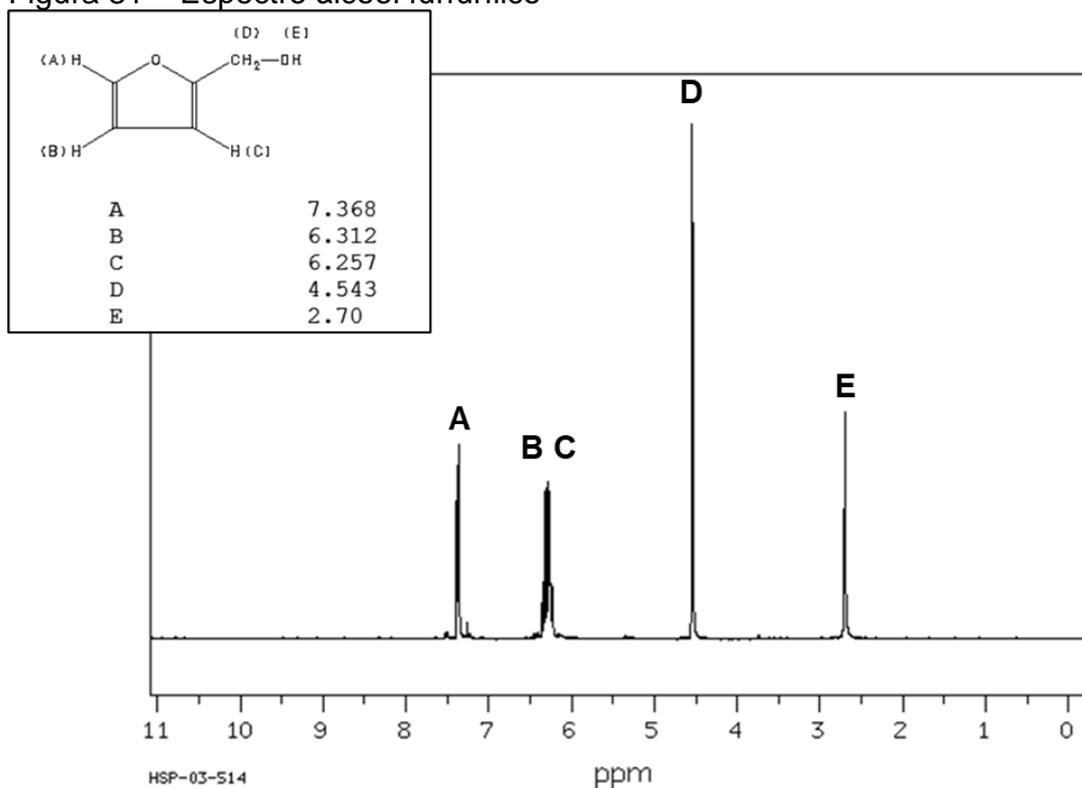
Nos resultados do RMN-1H não foi possível detectar deslocamentos na amostra de amido esterificado, quando comparado com a literatura (Fig.31) que apresenta deslocamento em 3.75 ppm.

Figura 30 – RMN-1H de furano incorporado em polímero Polibutanodieno (PBD)



Fonte: Adaptado de Trovatti et al., 2015.

Figura 31 – Espectro álcool furfurílico



Fonte: Adaptado Chemical Book.

5.4. Reticulação do amido por reação de DA

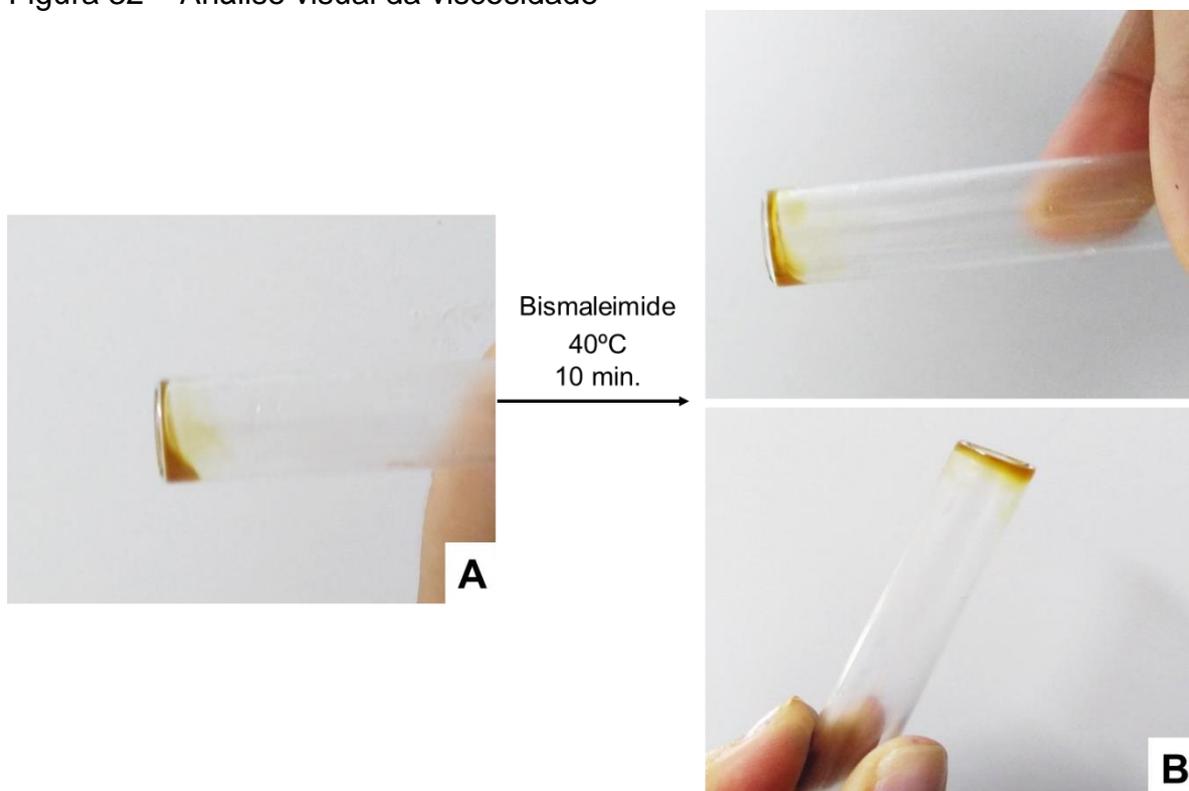
Para confirmação da efetividade da técnica de reticulação do amido foi realizada análise visual de viscosidade.

5.4.1. Análise visual de viscosidade e formação do hidrogel

Através da observação visual da viscosidade da amostra de amido, foi possível observar que antes de adicionar a bismaleimida o material apresentava baixa viscosidade e após adicionar a bismaleimida, houve um aumento visual desta viscosidade, com a formação do hidrogel (Figura 32 e material complementar de vídeo) sugerindo assim que houve a reação de DA com a reticulação das moléculas de amido, através da reação entre furano-bismaleimida. Corroborando com dados da literatura em que nanofibras de celulose foram modificadas e reticuladas através da reação de DA e os autores concluíram que a viscosidade da mistura (celulose modificada + bismaleimida) aumentou progressivamente, deixando de fluir e assumindo caráter de gel. Sugerindo que foram formadas pontes entre as nanofibras

de celulose devido a formação de ligações furano- maleimida via reação de DA (Fig. 33, (Kramer *et al.*, 2019)).

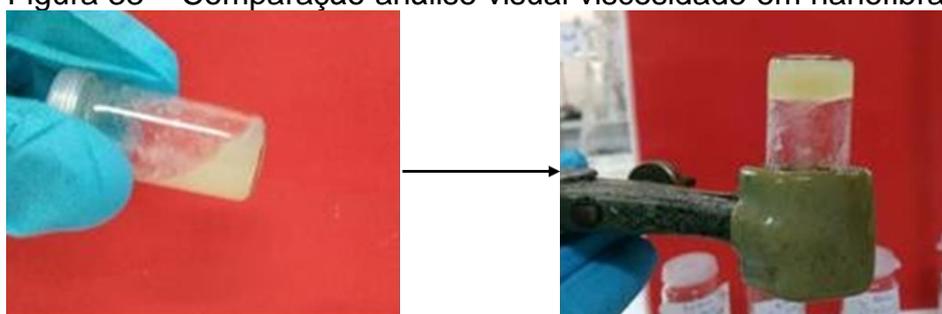
Figura 32 – Análise visual da viscosidade



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: A – Antes da reticulação; B – Após reticulação.

Figura 33 – Comparação análise visual viscosidade em nanofibra de celulose via DA



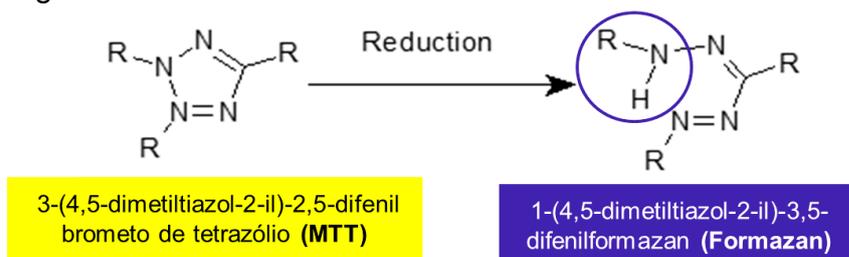
Fonte: Adaptado de Kramer *et al.*, 2019.

5.5. Citotoxicidade celular - MTT

A viabilidade celular foi determinada utilizando o método MTT, que tem como princípio ser um teste colorimétrico. De maneira geral desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células que são metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio do corante MTT, transformando-o de um composto de coloração amarela

em um composto de coloração azul escuro/roxa, chamada de formazan [1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan], que são cristais insolúveis em soluções aquosas (Fig. 34). A produção de formazan indica o estado funcional da cadeia respiratória e indica através da coloração se as células apresentam-se viáveis na amostra.

Figura 34 – Teste MTT

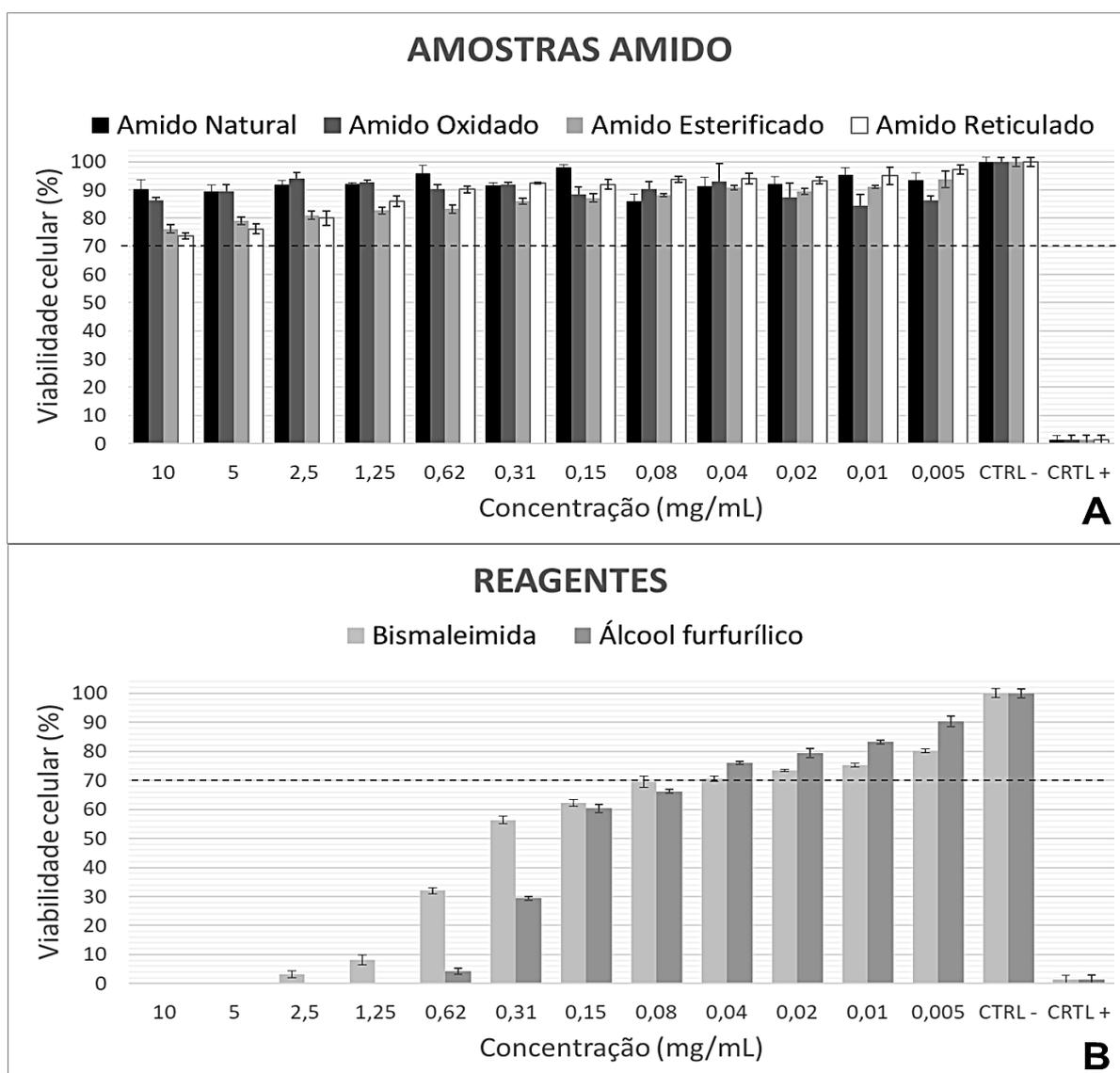


Fonte: Elaborada pela autora.

As amostras testadas foram: amido natural (controle), amido oxidado, amido esterificado, amido reticulado e reagentes (bismaleimida e álcool furfurílico). As barras representam as médias individuais \pm desvio padrão de cada amostra do experimento. O controle negativo mostrou uma percentagem padrão, ou seja, 100% de negatividade de citotoxicidade. Nos testes observou-se que nas amostras de amido (natural, oxidado, esterificado e reticulado) não foram consideradas tóxicas em todas concentrações testadas (Fig. 35A), apresentando uma viabilidade celular superior a 70%. Sugerindo ser um material com potencial para aplicações na área da saúde.

Já em relação aos reagentes utilizados nas reações químicas de modificação (bismaleimida e álcool furfurílico), as células foram viáveis a partir da concentração de 0,004mg/mL para ambas as amostras (Fig. 35B), sendo citotóxico (menor que 70% de viabilidade) em concentrações mais elevadas. O IC_{50} da bismaleimida foi de aproximadamente 0,29mg/mL (DP 0,004) e do álcool furfurílico aproximadamente de 0,12mg/mL (DP 0,002). Com base nos resultados encontrados, sugere-se que ambos reagentes não permaneceram livres para exercer o efeito tóxico após a reação química com o material, uma vez que o material demonstrou viabilidade superior a 70% em todas as etapas de modificações químicas e em todas concentrações testadas.

Figura 35 – Resultados da análise de viabilidade celular



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Legenda: A – Amostras amido; B – Reagentes.

6 CONCLUSÃO

- Conclui-se que houve sucesso na técnica de gelatinização, através da observação da quebra dos grãos de amido visualizada em MO.
- As modificações químicas na amostra amido natural para amido oxidado foram confirmadas através de FTIR onde foi possível observar que em comparação com a amostra controle houve o aparecimento da banda correspondente aos grupamentos C=O, sugerindo substituição da hidroxila (OH) do amido natural por ácido carboxílico (COOH) no amido oxidado. Confirmado através de RNM-1H em que observou-se diferença entre os prótons do amido natural e oxidado. E através da titulação condutimétrica, quantificou-se a presença de carboxilas no amido oxidado. Sugerindo sucesso na modificação.
- Sugere-se sucesso na etapa de esterificação, pois através do FTIR foi possível observar diminuição da banda de C=O e o aparecimento da banda correspondente aos anéis furânicos sugestivo da substituição do ácido carboxílico (COOH) do amido oxidado em furanos. Confirmado através do RNM-1H que foi possível observar os prótons característicos dos grupamentos furanos (H3, H4 e H5) na amostra de amido esterificado. Além disso, através da titulação condutimétrica quantificou-se que o grau de substituição de amido oxidado para esterificado foi de aproximadamente 13% de substituição.
- A etapa de reticulação com introdução da bismaleimida via reação de DA, foi realizada com êxito uma vez que analisou-se a formação do hidrogel através da análise visual de viscosidade.
- Através do teste de citotoxicidade, conclui-se que o material se demonstrou viável em todas etapas e, em todas as concentrações testadas.

Em conclusão, neste estudo, um método eficaz foi desenvolvido para preparar um amido modificado passível de mudança de viscosidade e formação de hidrogel, através da reticulação via reação de DA. Novos estudos podem ser realizados e esse novo material pode ser promissor para produção de novos materiais com propriedades e aplicações potenciais na área da saúde.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, A. J. Cross-linked alginate-gelatine beads: A new matrix for controlled release of pindolol. **Journal of Controlled Release**, 2004.
- ALTMAN, R. D.; MOSKOWITZ, R. Intraarticular sodium hyaluronate (Hyalgan®) in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee: A randomized clinical trial. **Journal of Rheumatology**, 1998.
- AMER, M. H. *et al.* Translational considerations in injectable cell-based therapeutics for neurological applications: concepts, progress and challenges. **npj Regenerative Medicine**, 2017.
- AOUADA, A. F.; MATTOSO, L. H. C. Hidrogéis Biodegradáveis: uma opção na aplicação como veículos carreadores de sistemas de liberação controlada de pesticidas. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, 2009.
- ASSUMPÇÃO, M. H. M. T. *et al.* Development of a biamperometric procedure for the determination of saccharin in dietary products. **Quimica Nova**, 2008.
- BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. [s.l: s.n.].
- BENNETT, G. The merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. **Journal of Hazardous Materials**, 1992.
- BOURTOOM, T.; CHINNAN, M. S. Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. **LWT - Food Science and Technology**, 2008.
- BRITO, G. F. *et al.* Biopolímeros , Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, 2011.
- BUWALDA, S. J. *et al.* **Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials** **Journal of Controlled Release**, 2014.
- CAO, W. *et al.* The preparation and biocompatible evaluation of injectable dual crosslinking hyaluronic acid hydrogels as cytoprotective agents. **Journal of Materials Chemistry B**, 2019.
- CARRABBA, M. *et al.* The safety and efficacy of different dose schedules of hyaluronic acid in the treatment of painful osteoarthritis of the knee with joint effusion. **European Journal of Rheumatology and Inflammation**, 1995.
- CARVALHO, A. J. F. *et al.* Thermoplastic starch/natural rubber blends. **Carbohydrate Polymers**, 2003.
- CARVALHO, A. J. F. Starch: Major sources, properties and applications as

thermoplastic materials. *In: Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. [s.l: s.n.]. .

CEREDA, M. P. *et al.* **Propriedades gerais do amido**. [s.l: s.n.].

CHOURA, M.; BELGACEM, N. M.; GANDINI, A. Acid-catalyzed polycondensation of furfuryl alcohol: Mechanisms of chromophore formation and cross-linking. **Macromolecules**, 1996.

CORMA CANOS, A.; IBORRA, S.; VELTY, A. **Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals****Chemical Reviews**, 2007.

COSTA, T. S. *et al.* Confirmando a Esterificação de Fischer por Meio dos Aromas. **Química Nova na Escola**, 2004.

DE, A. *et al.* DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA A RETICULAÇÃO DE QUITOSANA. **Quim. Nova**, 2011.

DRAGAN, E. S. **Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review****Chemical Engineering Journal**, 2014.

DROBNIK, J. Hyaluronan in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 1991. **Examination and Analysis of Starch and Starch Products**. [s.l: s.n.].

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Amidos. **Amioos**, 2015.

GANDINI, A. Polymers and Oligomers Containing Furan Rings. *In: [s.l: s.n.]. .*

GANDINI, A.; BELGACEM, M. N. Furans. *In: Handbook of Thermoset Plastics*. [s.l: s.n.]. .

GHANAATI, S. *et al.* Rapid vascularization of starch-poly(caprolactone) in vivo by outgrowth endothelial cells in co-culture with primary osteoblasts. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 2011.

GOA, K. L.; BENFIELD, P. Hyaluronic Acid: A Review of its Pharmacology and Use as a Surgical Aid in Ophthalmology, and its Therapeutic Potential in Joint Disease and Wound Healing. **Drugs**, 1994.

GOMES, M. E. *et al.* Influence of the porosity of starch-based fiber mesh scaffolds on the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured in a flow perfusion bioreactor. **Tissue Engineering**, 2006.

GREGORITZA, M.; BRANDL, F. P. **The Diels-Alder reaction: A powerful tool for the design of drug delivery systems and biomaterials****European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2015.

GUTOWSKA, A.; JEONG, B.; JASIONOWSKI, M. Injectable gels for tissue engineering. **Anatomical Record**, 2001.

- HALLÉN, L.; JOHANSSON, C.; LAURENT, C. Cross-linked hyaluronan (hylan B gel): A new injectable remedy for treatment of vocal fold insufficiency - An animal study. **Acta Oto-Laryngologica**, 1999.
- HAO, J. *et al.* Specific oxidation pattern of soluble starch with TEMPO-NaBr-NaClO system. **Carbohydrate Polymers**, 2016.
- HERRMANN, W. A.; KÖCHER, C. **N-Heterocyclic Carbenes** *Angewandte Chemie (International Edition in English)*, 1997.
- HOFFMAN, A. S. **Hydrogels for biomedical applications** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012.
- HOMMA, I. *et al.* Effects of carboxyl-group counter-ions on biodegradation behaviors of TEMPO-oxidized cellulose fibers and nanofibril films. **Cellulose**, 2013.
- ISOGAI, A.; SAITO, T.; FUKUZUMI, H. **TEMPO-oxidized cellulose nanofibers** *Nanoscale*, 2011.
- JABBARI, E. Hydrogels for Cell Delivery. **Gels**, 2018.
- JI, Y.; LIN, X.; YU, J. Preparation and characterization of oxidized starch-chitosan complexes for adsorption of procyanidins. **LWT**, 2020.
- KAMM, B.; KAMM, M. **Principles of biorefineries** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004.
- KATO, Y.; MATSUO, R.; ISOGAI, A. Oxidation process of water-soluble starch in TEMPO-mediated system. **Carbohydrate Polymers**, 2003.
- KHARKAR, P. M.; KIICK, K. L.; KLOXIN, A. M. Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments. **Chemical Society Reviews**, 2013.
- KIRITOSHI, Y.; ISHIHARA, K. Synthesis of hydrophilic cross-linker having phosphorylcholine-like linkage for improvement of hydrogel properties. **Polymer**, 2004.
- KRAMER, R. K. *et al.* Thermally reversible nanocellulose hydrogels synthesized via the furan/maleimide Diels-Alder click reaction in water. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.
- KUAKPETOON, D.; WANG, Y. J. Characterization of different starches oxidized by hypochlorite. **Starch/Staerke**, 2001.
- LEE, S. T. *et al.* Equilibrium and kinetic studies of copper(II) ion uptake by chitosan-tripolyphosphate chelating resin. **Polymer**, 2001.
- LIN, C. C.; METTERS, A. T. Metal-chelating affinity hydrogels for sustained protein release. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, 2007.

- LOPES, W. A.; FASCIO, M. Flow chart for infrared spectra interpretation of organic compounds. **Quimica Nova**, 2004.
- MANO, J. F.; KONIAROVA, D.; REIS, R. L. **Thermal properties of thermoplastic starch/synthetic polymer blends with potential biomedical applicability** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. **Anais...**2003
- MATHEW, S.; BRAHMAKUMAR, M.; ABRAHAM, T. E. Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch-chitosan blend films. **Biopolymers**, 2006.
- MONTIEL-HERRERA, M. *et al.* Furan–chitosan hydrogels based on click chemistry. **Iranian Polymer Journal (English Edition)**, 2015.
- MORAES CALVALCANTE, P. M. *et al.* Proposta de preparação e caracterização de ésteres: Um experimento de análise orgânica na graduação. **Educacion Quimica**, 2015.
- MOTARJEMI, Y.; LELIEVELD, H. **Food Safety Management: A Practical Guide for the Food Industry**. [s.l: s.n.].
- MOURA, M. R. DE *et al.* Porous alginate-Ca²⁺ hydrogels interpenetrated with PNIPAAm networks: Interrelationship between compressive stress and pore morphology. **European Polymer Journal**, 2005.
- NETO, C. G. T. *et al.* Permeability studies in chitosan membranes. Effects of crosslinking and poly(ethylene oxide) addition. **Carbohydrate Research**, 2005.
- NIMMO, C. M.; OWEN, S. C.; SHOICHET, M. S. Diels-alder click cross-linked hyaluronic acid hydrogels for tissue engineering. **Biomacromolecules**, 2011.
- NOORDOVER, B. A. J. *et al.* Enhancing the functionality of biobased polyester coating resins through modification with citric acid. **Biomacromolecules**, 2007.
- OVIEDO, I. R. *et al.* Design of a physical and nontoxic crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogel. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, 2008.
- PATEL, A.; MEQUANINT, K. Syntheses and characterization of physically crosslinked hydrogels from dithiocarbamate-derived polyurethane macroiniferter. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, 2008.
- PEPPAS, N. A. *et al.* **Hydrogels in pharmaceutical formulations** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000.
- PHELPS, E. A. *et al.* Maleimide cross-linked bioactive PEG hydrogel exhibits improved reaction kinetics and cross-linking for cell encapsulation and in situ delivery. **Advanced**

Materials, 2012.

PIERRE, G. *et al.* **TEMPO-mediated oxidation of polysaccharides: An ongoing story***Carbohydrate Polymers*, 2017.

POZO, C. *et al.* Study of the structural order of native starch granules using combined FTIR and XRD analysis. **Journal of Polymer Research**, 2018.

RAJAN, A.; SUDHA, J. D.; ABRAHAM, T. E. Enzymatic modification of cassava starch by fungal lipase. **Industrial Crops and Products**, 2008.

RATNAYAKE, W. S.; WASSINGER, A. B.; JACKSON, D. S. Extraction and characterization of starch from alkaline cooked corn masa. **Cereal Chemistry**, 2007.

SANTOS, T. C. *et al.* In vivo short-term and long-term host reaction to starch-based scaffolds. **Acta Biomaterialia**, 2010.

SINGH, AKHILESH V.; NATH, L. K.; SINGH, ANUDWIPA. Pharmaceutical, food and non-food applications of modified starches: A critical review. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, 2010.

SMITH, L. J. *et al.* Diels-Alder Click-Cross-Linked Hydrogels with Increased Reactivity Enable 3D Cell Encapsulation. **Biomacromolecules**, 2018.

SOEST, J. J. G. VAN *et al.* Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, 1995.

SOUZA, M. V. N. DE. Utilização do TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) na oxidação de álcoois primários e secundários. **Química Nova**, 2004.

STORPIRTIS, S. Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 2006.

SUMERLY, R. *et al.* Tecnologias, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas. **Fundação Cargill**, 2003.

TANAKA, Y.; GONG, J. P.; OSADA, Y. **Novel hydrogels with excellent mechanical performance***Progress in Polymer Science (Oxford)*, 2005.

TROVATTI, E. *et al.* Recycling Tires? Reversible Crosslinking of Poly(butadiene). **Advanced Materials**, 2015.

WRIGHT, G. F. The Furans. A.C.S. Monograph Series. A. P. Dunlop and F. N. Peters. Reinhold, New York, 1953. xix + 867 pp. Illus. + plates. \$18. **Science**, 1954.

WU, J. *et al.* Preparation and characterization of pullulan-chitosan and pullulan-carboxymethyl chitosan blended films. **Food Hydrocolloids**, 2013.

WU, Y. L. *et al.* Engineering Bioresponsive Hydrogels toward Healthcare Applications.

Macromolecular Chemistry and Physics, 2016.

XUE, F. *et al.* Development of DNA Based Active Macro–Materials for Biology and Medicine: A Review. *In: Biomaterials Science and Engineering*. [s.l: s.n.]. .

YI, Y.; WANG, Y.; LIU, H. Preparation of new crosslinked chitosan with crown ether and their adsorption for silver ion for antibacterial activities. **Carbohydrate Polymers**, 2003.