

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

Tatiane Araújo Soares

HIDROGÉIS RETICULADOS: BIOMATERIAIS COM POTENCIAL PARA MEDICINA
REGENERATIVA E APLICAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Araraquara, SP

2025

Tatiane Araújo Soares

HIDROGÉIS RETICULADOS: BIOMATERIAIS COM POTENCIAL PARA MEDICINA
REGENERATIVA E APLICAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Tese de Doutorado 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 Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientadora: Dra. Eliane Trovatti

Araraquara, SP

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

S657h Soares, Tatiane Araújo.

Hidrogéis reticulados: biomateriais com potencial para medicina regenerativa e aplicação microbiológica/Tatiane Araújo Soares. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2025.
123f.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química medicinal – UNIARA

Orientador: Profa. Dra. Eliane Trovatti

1. Hidrogel. 2. Ácido hialurônico. 3. Bismaleimida. 4. Diels-alder. 5. Medicina regenerativa. I. Título.

CDU 577.4

TATIANE ARAÚJO SOARES


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

Araraquara, 25 de novembro de 2025.


BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 ELIANE TROVATTI
Data: 02/12/2025 09:26:31-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>


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

Documento assinado digitalmente
 MAURÍCIO CAVICCHIOLI
Data: 28/11/2025 08:32:37-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>


Prof. Dr. MAURÍCIO CAVICCHIOLI
Universidade de Araraquara – UNIARA

Documento assinado digitalmente
 LEANDRO FERNANDES
Data: 27/11/2025 12:19:08-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. LEANDRO FERNANDES
Escola de Engenharia / USP - São Carlos

Documento assinado digitalmente
 TAMIRES DE SOUZA NOSSA
Data: 26/11/2025 16:57:20-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof^a Dr^a TAMIRES DE SOUZA NOSSA
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo / IFSP –
Campus de Itapetininga

Documento assinado digitalmente
 ADENILDA CRISTINA HONORIO FRANÇA
Data: 25/11/2025 17:22:23-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof^a Dr^a ADENILDA CRISTINA HONORIO FRANÇA
Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT

TATIANE ARAÚJO SOARES

Formação acadêmica

2021 – Em andamento

Doutorado em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal
Universidade de Araraquara, UNIARA, Brasil.

Título: Hidrogéis Reticulados: Biomateriais com Potencial para Medicina
Regenerativa e Aplicação Microbiológica.

Orientadora: Eliane Trovatti.

2020 – 2022

Mestrado em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas.

Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Brasil.

Título: Efeito Imunomodulador da Cafeína Associada em Sistema de Liberação
Modificada Sobre Fagócitos e Células Tumorais da Mama.

Orientador: Eduardo Luzia França.

Coorientador: Elton Brito Ribeiro.

2016 - 2018

Especialização em Farmácia Clínica.

Faculdade de Quatro Marcos, FQM, Brasil.

Título: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA): Terapias Disponíveis e Riscos
de Recidiva.

Orientadora: Simone Miller da Silva Campos.

2012 – 2016

Graduação em Farmácia. Faculdade de Quatro Marcos, FQM, Brasil.

Título: Incidência e Recidiva de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no
Município de Mirassol d'Oeste - MT entre 2010 e 2015.

Orientador: Gustavo Zaninelo Oliveira.

Artigos Publicados em Periódicos

1. Torres, A. H. F., **Soares, T. A.**, Pereira, R. B., Gomes, P., Garrido, S. S. Interplay between the immune system and the microbiome of human skin and its modulation by antimicrobial peptides. *International Immunopharmacology*, v. 168, p. 115754, 2025.
2. Simas, T. F., **Soares, T. A.**, Dorm, B. C., Amaral, A. C., Lustri, W. R., Vaz, L. G., Fernandes, L., Trovatti, E. Soybean Oil-Based Bioadhesive: An Alternative to Sutures. *Polymers for Advanced Technologies*, v. 36, p. 1-10, 2025.
3. Picoli, P. M. C., **Soares, T. A.**, Gonçalves, A. M., Trovatti, E. Carrageenan-amino acid interaction as a tool for understanding atherosclerotic process initiation. *Electronic Journal of General Medicine*, v. 21, p. 590, 2024.

4. Soares, T. A., Torres, A. H. F., Dorm, B. C., Amaral, A. C., de Souza Nossa, T., Trovatti. Alginate-cysteine conjugate: antimicrobial hydrogel from natural source. *Journal of Polymer Research*, v. 31, p. 333, 2024.

5. Soares, T. A., Torres, A. H. F., Dalcin, L. D. L., Gonçalves, L. C. O., de Magalhães Neto, A. M., Honorio-França, A. C., Ribeiro. E. B., França, E. L. Modified Caffeine Release System and Its Immunomodulatory Effects on Breast Tumor Cells and Blood Phagocytes. *Advances in Biological Chemistry.*, v. 13, p. 25-41, 2023.

6. Dalcin, L. D. L., Fagundes-Triches, D. L. G., de Queiroz, A. A., Torres, A. H. F., França, D. C. H., **Soares, T. A.**, Ramos, L. C, S., Antônio, C. R. S. S., Fujimori, M., França, E. L.; Honorio-França, A. C. Resistin Modulates the Functional Activity of Colostral Macrophages from Mothers with Obesity and Diabetes. *Biomedicines*, v. 10, p. 2332, 2022.

7. Torres, A. H. F., **Soares, T. A.**, Dalcin, L. D. L., Rodrigues, G. F. S., Ribeiro, E. B., Honorio-Franca, A. C., Franca, E. L. Evaluation of Viscosity and Oxidative Stress Induction in MCF-7 Cells Treated with Melatonin Associated with Microemulsion and Polyethylene Glycol 400. *Science of Advanced Materials*, v. 13, p. 1-9, 2021.

8. Torres, A. H. F., **Soares, T. A.**, Silva, K. P. G., Magalhaes Neto, A. M., Honorio-Franca, A. C., Franca, E. L. Caffeine Chronopharmacology Release as a Biomodulating Agent. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 8, p. 1509-1521, 2019.

Capítulos de livros publicados

1. Silva, C. G., Torres, A. H. F., **Soares, T. A.**, Dalcin, L. D. L., Franca, E. L., Honorio-Franca, A. C. Aspectos reológicos do fruto *Dillenia indica* e seus efeitos sobre a atividade funcional de células do sangue humano. In: André Henrique Furtado Torres; Aline do Carmo França Botelho. (Org.). Aspectos reológicos do fruto *Dillenia indica* e seus efeitos sobre a atividade funcional de células do sangue humano. 1ed. Goiás: Editora Volans, 2021, v. 1, p. 70-81.

2. Oliveira, I. T. A., Torres, A. H. F., **Soares, T. A.**, Dalcin, L. D. L., Honorio-Franca, A. C., Franca, E. L. Efeito imunomodulador do Melão-De-São-Caetano (*Momordica charantia*) no perfil de estresse oxidativo e hemorreológico de células do sangue humano. In: André Henrique Furtado Torres; Aline do Carmo França Botelho. (Org.). Efeito imunomodulador do Melão-De-São-Caetano (*Momordica charantia*) no perfil de estresse oxidativo e hemorreológico de células do sangue humano. 1ed. Goiás: Editora Volans, 2021, v. 1, p. 83-93.

3. Torres, A. H. F., **Soares, T. A.**, Dalcin, L. D. L., Honorio-Franca, A. C., Franca, E. L. Desenvolvimento e caracterização de um neomaterial microemulsionado associado com polietilenoglicol 400 (PEG400). In: André Henrique Furtado Torres; Aline do Carmo França Botelho. (Org.). Desenvolvimento e caracterização de um neomaterial microemulsionado associado com polietilenoglicol 400 (PEG400). 1ed. Goiás: Editora Volans, 2021, v. 1, p. 94-107.

4. Nunes, A. K., Torres, A. H. F., **Soares, T. A.**, Dalcin, L. D. L., Franca, E. L., Honorio-Franca, A. C. Efeito do extrato da folha de Psidium guajava na atividade fagocítica de células do sangue humano. 1ed. Goiás: Editora Volans, 2021, v. 1, p. 56-69.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **Soares, T. A.**, Torres, A. H. F.; Trovatti, E. Importância da Biotecnologia no Desenvolvimento de Novos Biomateriais para Aplicação em Medicina Regenerativa do Tecido Cartilaginoso. In: III Congresso Brasileiro de Biotecnologia Online, 2023. Anais do III Congresso Brasileiro de Biotecnologia On-line, 2023. v. 4. p. 1-231.

2. Simas, T. F., Trovatti, E., Torres, A. H. F., **Soares, T. A.** Modification Of Soybean Oil For The Development Of Bioadhesives. In: 1st Congress of Scientific Initiation in Biotechnology 6th Forum of Scientific Initiation - PICBiotec, 2023, Araraquara. 1st Congress of Scientific Initiation in Biotechnology 6th Forum of Scientific Initiation - PICBiotec, 2023. p. 21-21.

3. Trovatti, E., Antunes, B. A., Dorm, B. C., **Soares, T. A.**, Torres, A. H. F. Crosslinking starch with Diels-Alder reaction: water-soluble materials and water-mediated processes. In: 6th International Conference on Material Science & Nanotechnology, 2023, Italy. 6th International Conference on Material Science & Nanotechnology, 2023.

4. Simas, T. F., Torres, A. H. F., Trovatti, E., **Soares, T. A.** Modificação de Óleo de Soja Para Desenvolvimento de Bioadesivos. In: XVIII Congresso de Iniciação Científica, 2023, Araraquara. XVIII Congresso de Iniciação Científica Universidade de Araraquara, UNIARA, 2023. p. 181-181.

5. Simas, T. F., **Soares, T. A.**, Trovatti, E. Síntese de Novo Polímero a Base de Ácido Adípico para Aplicação na Medicina Regenerativa. In: XVII Congresso de Iniciação Científica Universidade de Araraquara. UNIARA, 2022, Araraquara. XVII Congresso de Iniciação Científica Universidade de Araraquara, uniara, 2022. v. 17. p. 1-263.

6. Camillo, A. M., Silva, J. Z., Dorm, B. C., **Soares, T. A.**, Trovatti, E. Modificação Química de Óleos vegetais para a Síntese de Monômeros Fotopolimerizáveis. In: XVII Congresso de Iniciação Científica Universidade de Araraquara, 2022, Araraquara. XVII Congresso de Iniciação Científica Universidade de Araraquara, 2022. v. 17. p. 1-263.

7. **Soares, T. A.**, Torres, A. H. F., Dalcin, L. D. L., Honorio-Franca, A. C., Franca, E. L. Papel da Cafeína Associada a Microemulsão na Indução do Estresse Oxidativo de Células Mononucleares e MCF-7. In: VII Workshop do PPGIP, 2021, Barra do Garças. Anais VII Workshop do PPGIP, 2021. v. 1. p. 24-24.

8. Torres, A. H. F., **Soares, T. A.**, Honorio-Franca, A. C., Franca, E. L., Trovatti, E., Garrido, S. S. Análise da Viscosidade do Biomaterial para Liberação Modificada de Fármacos. In: III Workshop do Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas, 2021, Alfenas - MG. Anais do III Workshop do Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas, 2021. p. 89-90.

9. Torres, A. H. F., Silva, C. G., **Soares, T. A.**, Dalcin, L. D. L., Honorio-Franca, A. C., Franca, E. L. O Efeito do Extrato de Dillenia Indica na Atividade Microbica de

Fagócito Mononucleares para Eliminação de *Escherichia Coli* Enteropatogênica. In: Congresso Online de Infectologia, 2020, Cuiabá/MT. Anais do I Congresso Online de Infectologia, 2020. v. 1. p. 1-2.

10. Torres, A. H. F., Dalcin, L. D. L., **Soares, T. A.**, Honorio-Franca, A. C., Franca, E. L. Efeito da Melatonina Associada à Sistema Microemulsionado sobre Células Tumorais da Mama. In: I Congresso Internacional de Medicina e Saúde, 2020. Congresso Internacional de Medicina e Saúde. Barra do Garças: Revista Panorâmica, 2020. v. 32. p. 137-137.

11. Soares, T. A., Torres, A. H. F., Honorio-Franca, A. C., Franca, E. L. Efeitos Imunomoduladores da Cafeína sobre a Atividade da Enzima Superóxido Dismutase de Células Tumorais da Mama. In: I Congresso Internacional de Medicina e Saúde, 2020. Congresso Internacional de Medicina e Saúde. Barra Do Garças: Revista Panorâmica, 2020. v. 32. p. 121-121.

DEDICATÓRIA

Primeiramente, agradeço a **Deus**, pois sem ele eu não teria chegado até aqui. Obrigada, por manter viva em mim a fé e a esperança, e por ser a luz que ilumina o meu caminho.

Ao amor da minha vida, meu querido esposo **André Henrique Furtado Torres**, agradeço por todo o amor, cuidado e apoio incondicional. Obrigada por cada conselho, por estar sempre ao meu lado e por nunca medir esforços para me ajudar a superar os desafios e celebrar as minhas conquistas.

Ao meu amado filho **José Sérgio Araújo Torres**. Filho, você é e sempre será o presente mais precioso que Deus me deu. Mesmo tão pequeno, você me ensina lições valiosas todos os dias.

Ao meu querido avô **Jovelino de Araújo** (*in memoriam*), que mesmo não estando presente fisicamente sempre estará presente em meu coração.

Aos meus amados pais **Sérgio Soares** e **Maria de Araújo** por todos ensinamentos, amor e carinho.

As minhas queridas irmãs, **Bruna Rafaela de Araújo Soares** e **Paula Rosângela Araújo Soares** por serem meu refúgio e fortaleza.

A minha sobrinha, **Isadora Soares Assunção**, você é a princesa das nossas vidas. Mesmo tão pequenina, nos ensina tanto e enche meu coração de amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sua constante proteção, pelas bênçãos concedidas e por sempre me guiar pelos melhores caminhos.

Ao meu pai, Sérgio Soares, e a minha mãe, Maria de Araújo, por todos os ensinamentos, incentivo e por sempre acreditarem em mim.

As minhas queridas irmãs, Bruna Rafaela de Araújo Soares e Paula Rosangela de Araújo Soares por estarem comigo nessa caminhada da vida, sempre apoiando e acreditando umas nas outras.

Ao meu amado esposo, André Henrique Furtado Torres, por estar ao meu lado em todos os momentos, sendo meu porto seguro e meu escudo protetor em tantas ocasiões. Agradeço profundamente por todo o amor, compreensão, paciência e apoio durante esta jornada, que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Ao meu amado filho, José Sérgio Araújo Torres, que enche minha vida de luz e torna cada dia mais belo. Meu anjinho, obrigada por caminhar comigo nesta trajetória da vida e dos estudos, sua presença é meu maior presente.

Às minhas queridas amigas Ângela e Dona Francisca, agradeço profundamente pelos conselhos, pelas risadas e pelas histórias compartilhadas. Levarei cada momento com vocês para sempre em meu coração, assim como os valiosos aprendizados sobre Deus que tive com vocês.

À minha orientadora, Professora Dra. Eliane Trovatti, obrigada por confiar em mim para a realização deste trabalho, acompanhando cada etapa da minha jornada durante o doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal, agradeço pela oportunidade realizar este sonho realidade.

Gostaria de agradecer imensamente a todos os professores do Programa, pelo conhecimento compartilhado e pelo apoio constante. As secretárias Sandra Pavanelli e Rosana Pazini, meu sincero agradecimento pela atenção, carinho e dedicação, sempre dispostas a oferecer o melhor para os alunos.

Aos colegas do Laboratório de Biomateriais e Biotecnologia, agradeço pela companhia, pelo apoio e pela colaboração ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho. Afinal, a ciência é construída em conjunto, e ninguém faz nada sozinho.

Agradeço de coração às minhas amigas, que sei que levarei para vida toda: Bruna e Rauany, agora mães da Marina e da Helena, que tornaram essa caminhada ainda mais especial. Meu agradecimento também às queridas Jéssica Fodra, Vivian e Benedito (Neto), pelas risadas, pelas palavras de incentivo e pela parceria constante durante toda a jornada do doutorado.

À CAPES, meu agradecimento pelo apoio financeiro concedido por meio da bolsa, essencial para a realização deste trabalho.

Agradeço também à banca de qualificação, composta pela Dra. Adenilda Cristina Honório França e pelo Dr. Lísias Pereira Novo, pela gentileza, atenção e valiosas contribuições que enriqueceram e aprimoraram a qualidade desta pesquisa.

Agradeço à banca de defesa, composta pela Dra. Adenilda Cristina Honório França, Dra. Tamires de Souza Nossa, Dr. Leandro Fernandes e Dr. Maurício Cavicchioli por gentilmente aceitarem o convite para avaliar este trabalho.

Minha eterna gratidão a todos que, de maneira direta ou indireta, colaboraram para a realização desta pesquisa.

“A ciência não é infalível, posto que está em constante evolução, mas sempre aponta para o caminho com menor probabilidade de erro.”

José Gil Zipf

“O fim das coisas é melhor que o seu início.”

Eclesiastes 7:8

RESUMO

Os avanços na medicina e tecnologia levaram a um aumento na expectativa de vida da população mundial. Com o envelhecimento, no entanto, surgem desafios relacionados à saúde, incluindo doenças crônicas, lesões e degeneração dos tecidos. Nesse contexto, a medicina regenerativa desempenha um papel muito importante, onde cada vez mais se faz necessário a ampliação de biomateriais. Dentre os biomateriais, os polímeros destacam-se por sua ampla versatilidade estrutural e funcional, sendo os hidrogéis considerados um dos mais promissores para aplicações em medicina regenerativa, especialmente aqueles formados pelo biopolímero ácido hialurônico (HA), devido à sua biocompatibilidade e biodegradação. Esse estudo propõe o desenvolvimento de um biomaterial polimérico capaz de reticular rapidamente em condições fisiológicas. A rápida reticulação visa permitir a injeção do material em forma líquida, seguida de sua geleificação. O ácido hialurônico foi modificado com furfurilamina (HA-Furano) para posterior reticulação por meio da reação Diels-Alder, para que essa reação fosse possível foi sintetizada uma bismaleimida (BM) solúvel em água a partir do aminoácido lisina. Os materiais foram caracterizados por titulação condutimétrica, FTIR, RMN, análise térmica, teste de reticulação e análise reológica. Além disso, foram realizadas análises biológicas, que mostraram o potencial de aplicação desses materiais na área da saúde, uma vez que não apresentaram toxicidade para as células. Foi observado por meio da titulação condutimétrica uma substituição de 40% por grupamento furânico após a modificação do HA com a furfurilamina. As análises de FTIR e RMN permitiram confirmar a introdução do grupo furano na estrutura do ácido hialurônico, além de evidenciar a formação da BM e a reticulação do HA mediada por essa molécula. A reticulação ocorreu em um curto período de tempo em aproximadamente 1 minuto após o contato do HA-Furano com a BM, o aumento da viscosidade foi confirmado por meio da análise visual e análises reológicas.

Palavras chave: Hidrogel; Ácido hialurônico; Bismaleimida; Diels-alder; Medicina Regenerativa.

ABSTRACT

Advances in medicine and technology have led to an increase in the life expectancy of the world's population. With ageing, however, health-related challenges arise, including chronic diseases, injuries and tissue degeneration. In this context, regenerative medicine plays a very important role, where the expansion of biomaterials is increasingly necessary. Among biomaterials, polymers stand out for their wide structural and functional versatility, with hydrogels considered one of the most promising for applications in regenerative medicine, especially those formed by the biopolymer hyaluronic acid (HA), due to their biocompatibility and biodegradability. This study proposes the development of a polymeric biomaterial capable of rapid cross-linking under physiological conditions. Rapid cross-linking aims to allow the injection of the material in liquid form, followed by its gelation. Hyaluronic acid was modified with furfurylamine (HA-Furano) for subsequent cross-linking through the Diels-Alder reaction. To enable this reaction, a water-soluble bismaleimide (BM) was synthesised from the amino acid lysine. The materials were characterised by conductometric titration, FTIR, NMR, thermal analysis, cross-linking test and rheological analysis. In addition, biological analyses were performed, which showed the potential for application of these materials in the health field, since they did not present toxicity to cells. Conductometric titration showed a 40% replacement by furanoic group after modification of HA with furfurylamine. FTIR and NMR analyses confirmed the introduction of the furan group into the hyaluronic acid structure, as well as demonstrating the formation of the BM and the HA cross-linking mediated by this molecule. Cross-linking occurred in a short period of time, approximately 1 minute after contact between HA-Furan and BM, and the increase in viscosity was confirmed by visual analysis and rheological analyses.

Keywords: Hydrogel, Hyaluronic acid, Bismaleimide, Diels-alder, Regenerative Medicine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da formação do ácido hialurônico reticulado por meio da ligação furano-maleimida.....	16
Figura 2. Esquema inicial proposto para a reticulação do polímero com a bismaleimida (a); em seguida, representação do material final obtido e do mecanismo de reticulação que efetivamente ocorreu, resultando na formação de pontes dissulfeto (b).....	17
Figura 3. Organograma dos capítulos e a relação entre as principais etapas desenvolvidas.....	19
Figura 4. Diagrama esquemático da aplicação de hidrogel para reparo tecidual.....	25
Figura 5. Fórmula estrutural do ácido hialurônico.....	26
Figura 6. Ilustração da síntese do ácido hialurônico.....	27
Figura 7. Diagrama esquemático da reticulação do ácido hialurônico.....	28
Figura 8. Reação de Diels-Alder e retro Diels-Alder.....	31
Figura 9. Reação de Diels Alder envolvendo furano e maleimida.....	32
Figura 10. Compostos furânicos derivados de furfural e hidroximetilfurfural.....	33
Figura 11. Esquema da síntese de 5-hidroximetilfurfural a partir da celulose.....	34
Figura 12. Estrutura geral de um monômero de bismaleimida.....	36
Figura 13. Esquema da síntese do ácido hialurônico modificado com a furfurilamina (a) Reação de enxertia do furano na superfície do ácido hialurônico através da ligação entre o grupamento carboxílico presente na molécula de ácido hialurônico com a amina presente na furfurilamina (b).....	38
Figura 14. Esquema da síntese de aduto furano anidrido maleico (a) e estrutura química do anidrido maleico, furano e a formação do aduto furano anidrido maleico (b).....	39
Figura 15. Esquema da síntese de bismaleimida solúvel em água	40

Figura 16. Esquema da reticulação do ácido hialurônico com a bismaleimida (a) e estruturas químicas das moléculas de HA-Furano, BM e do HA reticulado (b).....	42
Figura 17. Titulação condutimétrica das amostras de ácido hialurônico (a) e de ácido hialurônico modificado com furfurilamina (b).....	47
Figura 18. FTIR das amostras de Ácido Hialurônico, furfurilamina e HA-Furano.....	49
Figura 19. Espectro de FTIR das amostras de aduto furano anidrido maleico, lisina pura e BM-Lis.....	50
Figura 20. Espectros de ¹ H RMN do ácido hialurônico e HA-Furano.....	51
Figura 21. Espectros de ¹ H RMN aduto, lisina e BM-Lis.....	52
Figura 22. Espectros de ¹ H RMN HA-Furano, HA-Furano-BM-PEG e HA-Furano-BM-Lis.....	53
Figura 23. Espectros de ¹ H RMN HA-Furano-BM-PEG e HA-Furano-BM-Lis antes e após o ensaio de reticulação.....	54
Figura 24. Curvas de aquecimento DSC HA, HA-Furano, HA-Furano-Lis, HA-Furano-BM-PEG.....	55
Figura 25. Curvas termogravimétrica HA-Furano-BM-Lis e HA-Furano-BM-PEG....	57
Figura 26. Mudanças visuais observadas no HA natural, HA-Furano e HA-Furano-BM-PEG e HA-Furano-BM-Lis	58
Figura 27. Caracterizações reológicas dos hidrogéis antes e após a reticulação com BM-PEG e BM-Lis. Viscosidade em função da taxa de cisalhamento (a), curva de fluxo de tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento (b), módulo de armazenamento e módulo de perda em função da deformação de cisalhamento (c), módulo de armazenamento e módulo de perda em função da frequência angular (d)	60
Figura 28. Resultado teste de reticulação, HA (A), HA-Furano (B), HA-Furano-BM-Lis (c) e HA-Furano-BM-PEG (d).....	63
Figura 29. Esquema da conversão intracelular de resazurina azul não fluorescente em resorufina rosa fluorescente.....	64

Figura 30. Resultados da análise de viabilidade celular, HA, HA-Furano, HA-Furano-BM-PEG, HA-Furano-BM-Lis (a) e Furfurilamina, BM-Lis, BM-PEG (b).....	65
Figura 31. Viabilidade celular após a extrusão do hidrogel pela agulha.....	67
Figura 32. Estrutura do Alginato (Tipos de blocos de Alginato: G = ácido gulurônico, M = ácido manurônico).....	84
Figura 33. Ilustração esquemática da conjugação alginato-cisteína.....	87
Figura 34. Espectros FTIR de alginato, cisteína e alginato-Cys.....	92
Figura 35. Espectros de ¹ H-RMN de Alginato, cisteína e Alginato-Cys em D ₂ O.....	94
Figura 36. Resultados titulação condutimétrica das amostras de alginato.....	95
Figura 37. Análise termogravimétrica (A) e curvas de aquecimento DSC (B) para alginato e alginato-Cys.....	97
Figura 38. Amostras de alginato, alginato-cys e alginato-CaCl ₂	98
Figura 39. Alginato (A), alginato-cisteína (B) e alginato-CaCl ₂ (C).....	99
Figura 40. Resultados reológicos das amostras de alginato, alginato-Cys e alginato-CaCl ₂	101
Figura 41. Teste de reticulação Alginato-Cys (A), alginato-CaCl ₂ (B) e Alginato (C).....	102
Figura 42. Resultado teste de degradação das amostras de alginato e alginato-cisteína ao longo do período de estudo.....	104
Figura 43. Ensaio microbiológico <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	105
Figura 44. Resultados da viabilidade celular do Alginato e Alginato-Cys	106
Figura 45. Resultados da viabilidade celular da Cisteína em diferentes concentrações.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos países com o maior número de idosos.....	20
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC: Coleção de cultura do tipo americano (do inglês *American Type Culture Collection*)

BM: Bismaleimida

BM-Lis: Bismaleimida sintetizada a partir do aminoácido lisina

Cys: Cisteína

COOH: Grupo carboxila

CO₂: Dióxido de carbono

CaCl₂: Cloreto de cálcio

CuAAC: cicloadição azida-alcino Huisgen (do inglês *Azide-alkyne Huisgen cycloadditio*)

DA: Reação Diels-Alder

D₂O: Óxido de deutério

DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial (do inglês *Differential Scanning Calorimetry*)

DMSO: Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

DP: Desvio padrão

E. coli: *Escherichia coli*

EDC: 3-(3-Dimethylaminoopyl)-1-ethyl-carbodiimid hydrochoride

EESC-USP: Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo

ELSI-Brasil: Estudo longitudinal da saúde dos idosos brasileiros

EUBIA: European Biomass Industry Association

FTIR: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

F: Furfural

FC: Fatores de crescimento

GAG: Glicosaminoglicano não sulfatado 7

G': Módulo de elasticidade/armazenamento

G'': módulo viscoso/perda

HA: Ácido hialurônico

HA-Furano: Ácido hialurônico modificado com furfurilamina

HA-Furano-BM-Lis: Ácido hialurônico modificado com furfurilamina reticulado com bismaleimida-lisina

HA-Furano-BM-PEG: Ácido hialurônico modificado com furfurilamina reticulado com bismaleimida-PEG

HAS1: Hialuronano sintetase 1

HAS2: Hialuronano sintetase 2

HAS3: Hialuronano sintetase 3

HCl: Ácido clorídrico

HMF: Hidroximetilfurfural

LVE: Região linear viscoelástica

MCR 92: Reômetro Compacto Modular (do inglês *Modular Compact Rheometer*)

MEC: Matriz extracelular da pele

Mf: Massa final ou em diferentes tempos de remoção

Mi: Massa inicial

MSCs: Células-tronco mesenquimais

NaOH: Hidróxido de sódio

NH₂: grupo amina

NHS: N-Hydroxysuccinimide

OH: Hidroxila

PBS: Tampão fosfato-salino

PEG: Polietilenoglicol

pH: Potencial hidrogeniônico de uma solução

PM: Peso molecular

PRB: Population Reference Bureau

RMN: Ressonância magnética nuclear

S: Enxofre

S. aureus: Staphylococcus aureus

rDA: Retro Diels-Alder

TGA: Análise Termogravimétrica (do inglês *Thermogravimetric Analysis*)

T_{endset}: Temperatura Endset

T_{onset}: Temperatura Onset

UFC: Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

Introdução Geral	14
Objetivo Geral	18
Objetivos Específicos	18
Capítulo 1: Reticulação do ácido hialurônico modificado com furano por reação de Diels-Alder	20
1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. Medicina Regenerativa.....	21
2.2. Hidrogéis Injetáveis e ácido hialurônico.....	24
2.3. <i>Click Chemistry</i> e reação Diels-Alder.....	29
2.4. Compostos Furânicos.....	32
2.5. Bismaleimida.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1. Materiais.....	36
3.2. Síntese de ácido hialurônico com furfurilamina (HA-Furano)	37
3.3. Síntese do aduto furano anidrido maleico.....	39
3.4. Síntese de bismaleimida.....	40
3.5. Reticulação do ácido hialurônico modificado e bismaleimida por reação Diels-Alder.....	41
3.6. Caracterização dos Materiais.....	43
3.6.1. Titulação Condutimétrica.....	43
3.6.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	43
3.6.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	43
3.6.4. Análise Térmica.....	44
3.6.5. Análise Reológica.....	44

3.6.6. Ensaio de reticulação.....	45
3.6.7. Viabilidade celular.....	45
3.6.8. Viabilidade celular após a extrusão do hidrogel.....	46
3.6.9. Análise estatística.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
5. CONCLUSÃO.....	67
6. PERSPECTIVAS.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
Capítulo 2: Hidrogel de alginato modificado com cisteína: biomaterial para aplicação microbiológica.....	80
1. INTRODUÇÃO.....	82
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	85
2.1. Materiais.....	85
2.2. Métodos.....	85
2.2.1. Síntese do bioconjugado alginato-cisteína.....	85
2.2.2. Síntese do Alginato-Cloreto de Cálcio (alginato-CaCl ₂).....	88
2.3. Caracterização estrutural e físico-química.....	88
2.3.1. Caracterização espectroscópica.....	88
2.3.2. Titulação condutimétrica convencional.....	88
2.3.3. Análise térmica.....	89
2.3.4. Análise reológica.....	89
2.3.5. Teste de reticulação.....	89
2.3.6. Degradação hidrolítica.....	90
2.4. Caracterização biológica.....	90
2.4.1. Ensaio microbiológico.....	90

2.4.2. Viabilidade celular.....	91
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	92
4. CONCLUSÃO.....	107
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

INTRODUÇÃO GERAL

Biomateriais são um amplo grupo de materiais, naturais ou sintéticos, desenvolvidos para interagir de forma específica com sistemas biológicos, com aplicações médicas que incluem diagnóstico, terapêutica e regeneração de tecidos (HONG *et al.*, 2025). Sua classificação é baseada na composição química, abrangendo metais, cerâmicas, polímeros e compósitos (MARIN; BOSCHETTO; PEZZOTTI, 2020). Dentre os biomateriais, os polímeros se destacam por sua ampla versatilidade estrutural e funcional. Devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, esses materiais vêm ganhando destaque no desenvolvimento de soluções inovadoras para a área da saúde (ZHU *et al.*, 2021). Nos últimos anos, o interesse por esses polímeros tem crescido significativamente, especialmente em aplicações como sistemas de liberação controlada de fármacos (D'SOUZA; SHEGOKAR, 2016), engenharia de tecidos (SHOJARAZAVI *et al.*, 2021), curativos multifuncionais (YUAN *et al.*, 2023), e dispositivos biomédicos (SHARMA; SAHA; SATAPATHY, 2022).

A palavra polímero deriva da palavra grega "poli", que significa muitos, e "meros", que significa partes. Mais especificamente, os polímeros são moléculas formadas pela repetição de unidades menores, denominadas monômeros, unidas por ligações covalentes (KAUSHIK *et al.*, 2016; OLATUNJI, 2016). Os polímeros podem ser de origem natural ou sintéticos (KULKARNI *et al.*, 2012). Os polímeros naturais são materiais amplamente encontrados na natureza ou extraídos de plantas, animais ou microrganismos. Alguns exemplos de polímeros naturais são proteínas, celulose, quitosana, ácido hialurônico (HA) e alginato (CAILLOL, 2020).

Apesar de sua origem natural e de suas propriedades favoráveis, muitos desses polímeros apresentam estrutura inicialmente linear, como é o caso do ácido hialurônico e do alginato (LINS *et al.*, 2014; WEKWEJT *et al.*, 2024), o que limita sua estabilidade mecânica, resistência à degradação e capacidade de formar estruturas tridimensionais estáveis. Em razão disso, o uso de polímeros reticulados é preferido em aplicações biomédicas. A reticulação aumenta a robustez do material, melhora o controle sobre a liberação de fármacos e permite a criação de *scaffolds* com maior integridade estrutural para suporte celular. As reações "*click chemistry*" são amplamente usadas na reticulação de hidrogéis devido às suas condições de reação suaves, alta seletividade química e tempo de gelificação rápido, sem adicionar ou

produzir agentes de reticulação citotóxicos, aditivos químicos e subprodutos no processo de gelificação, além de apresentarem altos rendimentos (ZHU *et al.*, 2022). Essas reações envolvem carbonilas, ácidos carboxílicos e maleimidas (ESCHENBRENNER-LUX; KUMAR; WALDMANN, 2014; MIYAGAWA; HASEGAWA; YAMAMURA, 2023).

Os hidrogéis de ácido hialurônico (HA) natural e alginato são frequentemente reticulados por meio da condensação de suas cadeias. No entanto, apresentam limitações como baixa estabilidade, resistência mecânica reduzida e pode ser rapidamente degradado dentro do corpo (PÉREZ *et al.*, 2023). Para ampliar suas aplicações em diferentes áreas biomédicas, a modificação química das cadeias moleculares é geralmente necessária antes do processo de reticulação. As modificações do HA são facilitadas por sua estrutura linear e pela presença de grupos carboxila, hidroxila e N-acetila ao longo de sua cadeia (LUO *et al.*, 2023). A presença de um número significativo de grupos funcionais reativos, como carboxila e hidroxila no alginato também favorece a sua modificação (AGUERO *et al.*, 2021). Ligações covalentes são normalmente formadas entre cadeias poliméricas em hidrogéis reticulados quimicamente, e a maioria de suas ligações é forte e permanente quando comparada com as dos hidrogéis reticulados fisicamente (HU *et al.*, 2019). Diante dessas limitações e da necessidade de novos biomateriais para aplicações na área da saúde, este trabalho foi desenvolvido.

Este trabalho é composto por dois capítulos. O primeiro capítulo trata da modificação da molécula de HA, um polissacarídeo identificado há quase um século. Apesar do tempo decorrido desde sua descoberta, o HA continua a atrair grande interesse da comunidade científica devido às suas propriedades únicas e à sua relevância em diversos campos da química, biologia e medicina. Sua biocompatibilidade, elevada capacidade de retenção de água, viscoelasticidade e outras características vantajosas tornam o HA um biomaterial versátil e promissor (ABDEL-RAHMAN; ABDEL-MOHSEN, 2023). Na área médica, o ácido hialurônico tem sido amplamente estudado em processos que envolvem respostas imunológicas, cicatrização de feridas decorrentes de doenças infecciosas e oncológicas, mecanismos relacionados ao envelhecimento e em aplicações voltadas à medicina regenerativa (KHABAROV; BOYKOV; SELYANIN, 2015). O objetivo principal deste estudo foi modificar o ácido hialurônico (HA) com furfurilamina, a fim de incorporar um

grupamento furânico em sua estrutura, possibilitando sua posterior reticulação com uma bismaleimida em um curto intervalo de tempo, conforme ilustrado na Figura 1.

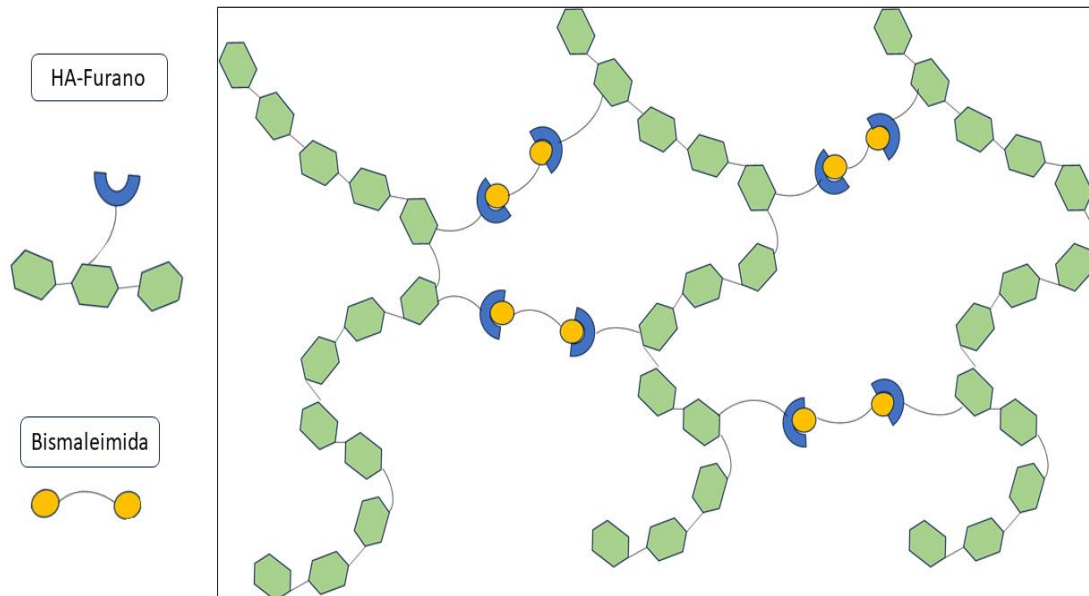


Figura 1. Ilustração da formação do ácido hialurônico reticulado por meio da ligação furano-maleimida.

Fonte: elaborada pela própria autora.

No segundo capítulo, uma mudança significativa em relação ao primeiro capítulo é a sua aplicabilidade. Inicialmente, o foco do projeto era a modificação do alginato com cisteína (alginato-Cys). O objetivo era sintetizar este conjugado de forma que o enxofre (S) presente na cisteína permanecesse disponível (livre), permitindo que posteriormente fosse reticulado com bismaleimida, formando um gel após a aplicação como ilustra a Figura 2(a). Contudo, os resultados obtidos não corresponderam às expectativas, resultando na formação de um gel durante a síntese do bioconjugado. Após algumas análises, observou-se que durante a síntese ocorreu a formação de pontes de dissulfeto, o que levou à rápida reticulação do biomaterial (Figura 2(b)). Essa descoberta inviabilizou a continuação do projeto conforme proposto inicialmente. No entanto, mesmo diante deste contratempo, o material demonstrou ser altamente promissor para aplicações na área biomédica, o que deu origem ao capítulo 2. Este trabalho foi publicado como artigo na revista *Journal of Polymer Research*, em 28 de outubro de 2024, e pode ser encontrado em:

<https://doi.org/10.1007/s10965-024-04178-y>. Portanto, este capítulo está sendo apresentado em um formato mais próximo ao de um artigo científico.

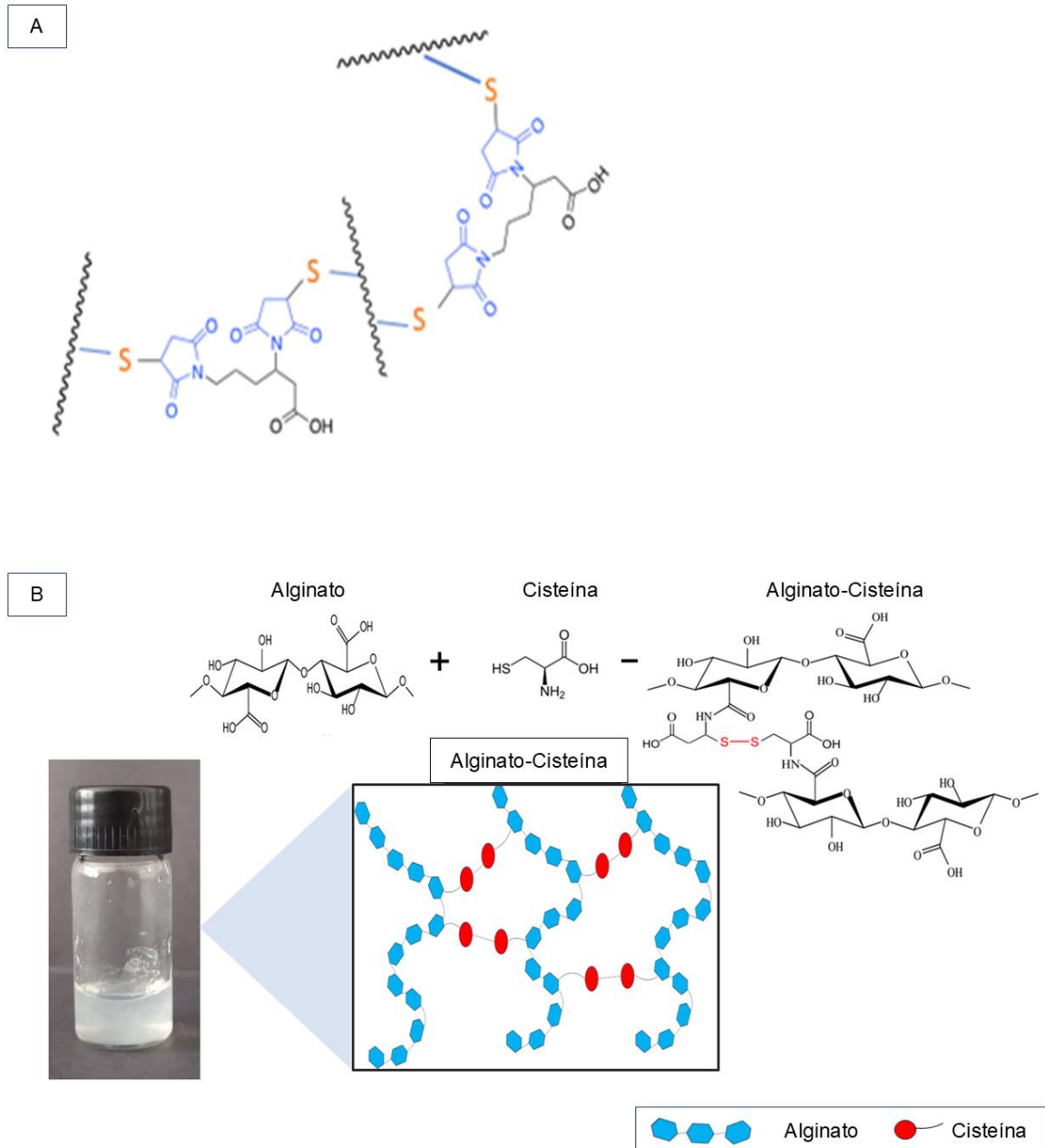


Figura 2. Esquema inicial proposto para a reticulação do polímero com a bismaleimida (a); em seguida, representação do material final obtido e do mecanismo de reticulação que efetivamente ocorreu, resultando na formação de pontes dissulfeto (b).

Fonte: elaborada pela própria autora.

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi a modificação química e a reticulação de novos biomateriais poliméricos para aplicações em medicina regenerativa e microbiológica, utilizando reações de Click Chemistry para sua síntese. Buscou-se: (a) desenvolver um biomaterial a partir do ácido hialurônico modificado com furfurilamina (HA-Furano), capaz de sofrer reticulação rápida em condições fisiológicas (pH ~7 e 37 °C), permitindo sua injeção na forma líquida e posterior gelificação em curto intervalo de tempo (0–5 minutos); (b) sintetizar uma bismaleimida solúvel em água, destinada à reticulação com o HA-Furano; e (c) promover a modificação química do alginato com L-cisteína, visando à obtenção de um biomaterial com propriedades antimicrobianas

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar a modificação química do ácido hialurônico com a furfurilamina, para substituir hidroxilas (OH) por grupamentos furânicos;
- b) Sintetizar aduto furano anidrido maleico, para posterior síntese da bismaleimida;
- c) Caracterizar as amostras de Aduto e bismaleimida, por meio de de ¹H RMN e FTIR para confirmar sucesso na síntese desses materiais;
- d) Realizar a reticulação do ácido hialurônico modificado com furfurilamina por reação Diels-Alder;
- e) Caracterizar por meio de FTIR, ¹H RMN, DSC, TGA, ensaio de reticulação e reologia as amostras antes e após a reticulação;
- f) Avaliar a porcentagem de células viáveis nas amostras, (HA, HA-Furano, HA-Furano-BM-Lis, HA-Furano-BM-PEG, Furfurilamina, BM-Lis e BM-PEG), antes e após as modificações químicas, por meio de ensaios de viabilidade celular;
- g) Avaliar a viabilidade celular antes e após a extrusão do hidrogel, nas amostras (HA, HA-Furano, HA-Furano-BM-Lis, HA-Furano-BM-PEG).
- h) Modificação química do alginato com L-cisteína;
- i) Caracterização Físico-Química do biomaterial (alginato-cisteína), por FTIR e ¹H RMN, análise térmica, teste de reticulação, análise reológica e degradação hidrolítica;

- j) Caracterização biológica, por determinação da viabilidade celular e atividade antimicrobiana por contato.

A Figura 3 apresenta um organograma elaborado para evidenciar, de maneira estruturada, os principais aspectos que compõem este estudo. Esse recurso visual foi desenvolvido com o propósito de organizar e esclarecer a disposição das etapas, capítulos e temas abordados, permitindo compreender, de forma mais clara e sistemática, a estrutura geral do trabalho.



Figura 3. Organograma dos capítulos e a relação entre as principais etapas desenvolvidas.

Fonte: elaborada pela própria autora.

CAPÍTULO I

Reticulação do ácido hialurônico modificado com furano por reação de Diels-Alder

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, temos notado um aumento significativo na expectativa de vida da população em todo o mundo, resultado direto dos avanços na medicina, na tecnologia e nas condições de vida (SUNDBERG *et al.*, 2023; UDDIN *et al.*, 2023). Não há um consenso definido sobre quem é considerado uma pessoa idosa, em diferentes países, essa definição varia, em alguns é aos 65 anos ou mais, em outros, é a idade da aposentadoria, enquanto em alguns é aos 60 anos ou mais como é o caso do Brasil (TINKER, 2002).

O estudo longitudinal da saúde dos idosos brasileiros (ELSI-Brasil) publicado em 2023, mostra que as estimativas para o ano de 2020 revelaram que um quarto da população brasileira tem idade ≥ 50 anos cerca de 54 milhões de pessoas, o equivalente a toda a população da Itália, e 30 milhões de brasileiros têm idade ≥ 60 anos (LIMA-COSTA *et al.*, 2023). Segundo Population Reference Bureau (PRB), em escala global, o Brasil se destaca como um dos países com uma das populações mais idosas, com 8,5% da população com mais de 65 anos, ocupando o 6º lugar em escala global, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos países com o maior número de idosos.

Classificação	País	% 65+ (da população total)	% População total (em milhões)
1	China	11,9	1398,03
2	Índia	6,1	1391,89
3	Estados Unidos	16	329,15
4	Japão	28,2	126,18
5	Federação Russa	14,6	146,73
6	Brasil	8,5	209,33
7	Alemanha	21,4	83,10

8	Indonésia	5,6	268,42
9	Itália	22,8	60,34
10	França	20,3	64,83

Fonte: Population Reference Bureau (PRB).

Com o envelhecimento da população, no entanto, surgem desafios relacionados à saúde, incluindo doenças crônicas, lesões e degeneração dos tecidos (OLAYA *et al.*, 2017). Neste contexto, a medicina regenerativa desempenha um papel crucial. Esta área da medicina oferece esperança ao buscar soluções inovadoras para tratar e até mesmo reverter danos nos tecidos e órgãos do corpo humano (ARITA; TOBITA 2023). Um dos biomateriais mais promissores utilizados na medicina regenerativa são os hidrogéis (DEPTULA *et al.*, 2023; THI *et al.*, 2023; MUKHERJEE *et al.*, 2024), em especial o hidrogel de ácido hialurônico (MORA-BOZA *et al.*, 2017; SARAVANAKUMAR *et al.*, 2022). O ácido hialurônico é uma substância naturalmente presente no corpo humano, conhecida por suas propriedades biocompatíveis e capacidade de retenção de água. Quando formulado como um hidrogel, ele pode ser usado como uma matriz tridimensional para suportar o crescimento celular, promover a regeneração de tecidos danificados e fornece um ambiente propício para o reparo tecidual (BORZACCHIELLO *et al.*, 2015).

No entanto, para que o hidrogel de ácido hialurônico seja eficaz na medicina regenerativa, é necessário que ele seja reticulado, ou seja, que suas moléculas se interliguem, geralmente usa-se um agente reticulante, para formar uma estrutura tridimensional mais estável. A reação de Diels-Alder tem se destacado como uma alternativa promissora para a reticulação do hidrogel. Essa reação química específica permite a formação de ligações cruzadas entre as moléculas de ácido hialurônico, resultando em um material mais resistente e durável (SEGURA *et al.*, 2005; COLLINS *et al.*, 2007; DING *et al.*, 2023).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Medicina Regenerativa

Com o aumento da idade média da população, também cresce a incidência de condições relacionadas ao envelhecimento (PETIT-ZEMAN *et al.*, 2001). Até 2020, as doenças crônicas - em particular doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e problemas respiratórios - causarão coletivamente mais de 70% de todas as mortes no mundo (TERZIC *et al.*, 2015). Além disso, entre as pessoas com 60 anos ou mais, metade sofre de deficiências, mais frequentemente deficiências visuais e auditivas ou osteoartrite (ZHAO *et al.*, 2022). No entanto, o aumento da população idosa e a prevalência de doenças degenerativas e incapacidades relacionadas à idade exigem o desenvolvimento de estratégias seguras e eficazes que limitem ou revertam a degeneração tecidual (TERZIC *et al.*, 2015). Atualmente, a medicina regenerativa é um foco importante de pesquisa não apenas para encontrar terapias, mas também para compreender a biologia básica e a patogênese das doenças (KOLIOS *et al.*, 2012).

Nesse contexto, o uso da engenharia de tecidos tem ganhado destaque. A engenharia de tecidos é um campo relativamente novo que utiliza células vivas, materiais biocompatíveis e fatores físicos e bioquímicos (fatores de crescimento) adequados, bem como suas combinações, para criar estruturas semelhantes aos tecidos. Mais frequentemente, o objetivo final é a implantação desses materiais no corpo para reparar uma lesão ou substituir a função de um órgão deficiente (MALDONADO *et al.*, 2023).

Os biomateriais utilizados para criar essas estruturas devem ser capazes de imitar os componentes naturais do tecido (LIU *et al.*, 2023). A seleção de biomateriais apropriados é crucial, pois eles precisam replicar as funções biológicas e mecânicas da matriz extracelular natural (MEC). Um número crescente de materiais como colágeno, alginatos, quitosana e ácido hialurônico, está sendo investigado devido à sua biocompatibilidade e à sua capacidade potencial de reconhecimento biológico (HE *et al.*, 2023).

No corpo humano existem tecidos com capacidade limitada de reparação e regeneração, representando um desafio que muitas vezes é difícil de superar pelos profissionais da saúde (SALGADO *et al.*, 2013) como é o caso do tecido cartilaginoso (RAMZAN *et al.*, 2023). A alta prevalência de lesões e a falta de capacidade intrínseca de regeneração tecidual da cartilagem deixa uma população propensa ao desenvolvimento de patologias deste tecido. Procedimentos artroscópicos revelam a

presença de lesões condrais em mais de 60% dos pacientes e as taxas de incidência anual destas lesões quase triplicaram entre 1996 e 2011 (MARTÍN *et al.*, 2019).

A cartilagem articular pode tolerar grande quantidade de estresse físico intenso e repetitivo, tem a capacidade de suportar cargas de até 5 vezes o peso corporal (SELLARDS; NHO; COLE, 2002). No entanto, manifesta uma incapacidade de regeneração. A cartilagem articular é constituída por duas fases diferentes: uma fase fluida (65-80%), consistindo principalmente de água e íons inorgânicos dissolvidos, e uma fase sólida (20-35%), composta por diferentes tipos de colágenos, proteoglicanos, e os condrócitos incorporados. Também contém uma pequena quantidade de lipídios, fosfolipídios, proteínas não colágenas e glicoproteínas. Juntas, essas substâncias mantêm a quantidade adequada de água dentro da matriz, o que confere suas propriedades mecânicas únicas (KRUEGER *et al.*, 2021).

A resposta da cartilagem à lesão difere de outros tecidos devido às suas características avasculares, aneurais e natureza linfática, o que impede o influxo de oxigênio, nutrientes e sinais bioquímicos que são necessários para o reparo eficaz da lesão. Além disso, a regeneração da cartilagem é promovida pela atuação dos condrócitos nativos, porém os condrócitos apresentam imobilidade e têm capacidade limitada de proliferação, e de células-tronco mesenquimais (MSCs), que têm populações dispersas e insuficientes para promover o reparo completo (SPILLER; MAHER; LOWMAN, 2011; ARMIENTO *et al.*, 2017).

Existe uma grande quantidade de materiais disponíveis para uso em patologias do tecido cartilaginoso, destacando-se os produtos comerciais Synvisc (Hylan GF-20) (CONROZIER; CHEVALIER, 2008; BOUTEFNOUCHET *et al.*, 2017) e o Osteonil® (Hialuronato de Sódio) (LEGRÉ-BOYER, 2015). Atualmente, existem muitos viscosuplementos compostos de ácido hialurônico que diferem em peso molecular, método de preparação, instruções de dosagem e características biológicas. Estes materiais, apesar de vastamente utilizados, são injetados com o propósito de lubrificação articular, absorção de choque, facilitando o movimento articular e desta forma, diminuindo a dor. Tendo em vista que esses materiais não tem o propósito de reparar o tecido lesionado, este efeito é temporário, uma vez que o ácido hialurônico pode ser degradado pelas enzimas hialuronidases e espécies reativas de oxigênio no organismo, sendo necessária sua reposição (TOROPITSYN *et al.*, 2022).

Outro tipo de material usado em ortopedia são os implantes ortopédicos (próteses) à base de cerâmica ou metais. Estes substituem permanentemente parte

da estrutura ósteo/cartilaginosa (CUSTERS *et al.*, 2009). Em ambos os tipos de materiais, próteses ou polímeros que substituem o líquido sinovial, os materiais não apresentam propriedades de reparo ou regeneração do tecido cartilaginoso. Desta forma, o desenvolvimento de um material com propriedades compatíveis tanto estruturalmente como quimicamente, teria que auxiliar na regeneração tecidual, sendo um desafio para medicina regenerativa. Vários estudos têm demonstrado que o uso de biomateriais para o reparo da cartilagem, vem sendo utilizados para apoiar a adesão, viabilidade, proliferação e diferenciação celular (WANG *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2021).

Para engenharia de tecidos, três componentes principais são necessários para que seja bem-sucedido o reparo tecidual, que incluem células, materiais de *bio-scaffolds* e fatores de crescimento. Entre estes, os *bio-scaffolds* são essenciais para fornecer ambientes biomiméticos para o crescimento celular e formação do novo tecido, sendo usados para substituição temporária do tecido (WANG *et al.*, 2017). O principal tipo celular usado na engenharia de tecido são as células-tronco mesenquimais. Dentre estas células as MSCs, são especialmente interessantes, pois são células multipotentes indiferenciadas que residem em vários tecidos humanos e têm potencial para se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, fibroblastos e outros tecidos de origem mesenquimal. No corpo humano, podem ser considerados reservatórios prontamente disponíveis de células reparadoras, capazes de mobilizar, proliferar e diferenciar-se no tipo de célula apropriado em resposta a certos sinais (POUNTOS *et al.*, 2007).

Os biomateriais à base de hidrogel, tanto de origem natural, quanto de origem sintética são particularmente promissores para o reparo tecidual, devido ao alto teor de água, que podem mimetizar o tecido. Hidrogéis compostos de alginato, fibrina, ácido hialurônico, polietilenoglicol (PEG), e poli (álcool vinílico) têm sido amplamente estudados, sendo usados como sistemas de entrega de fatores de crescimento (FC) e de células para engenharia de tecido (SEIMS; HUNT; CHOW, 2021).

2.2 Hidrogéis Injetáveis e ácido hialurônico

Recentemente, os hidrogéis injetáveis têm despertado interesse como uma opção atraente para a reparação de diversos tecidos, incluindo cartilagem, osso, pele, tecido cardíaco e nervos. A utilização de hidrogéis é promissora pois os materiais

usados são biocompatíveis e biodegradáveis, carregados com células e incorporando agentes bioativos, mediante uma injeção tópica minimamente invasiva, possibilitando o preenchimento preciso das lesões. Isso contribui para a distribuição eficaz de células e agentes bioativos, resultando em uma melhoria na entrega direcionada de terapias, como fatores de crescimento e medicamentos, promovendo assim o crescimento eficiente dos tecidos (TSANAKTSIDOU *et al.*, 2022) conforme exemplo ilustrado na Figura 4.

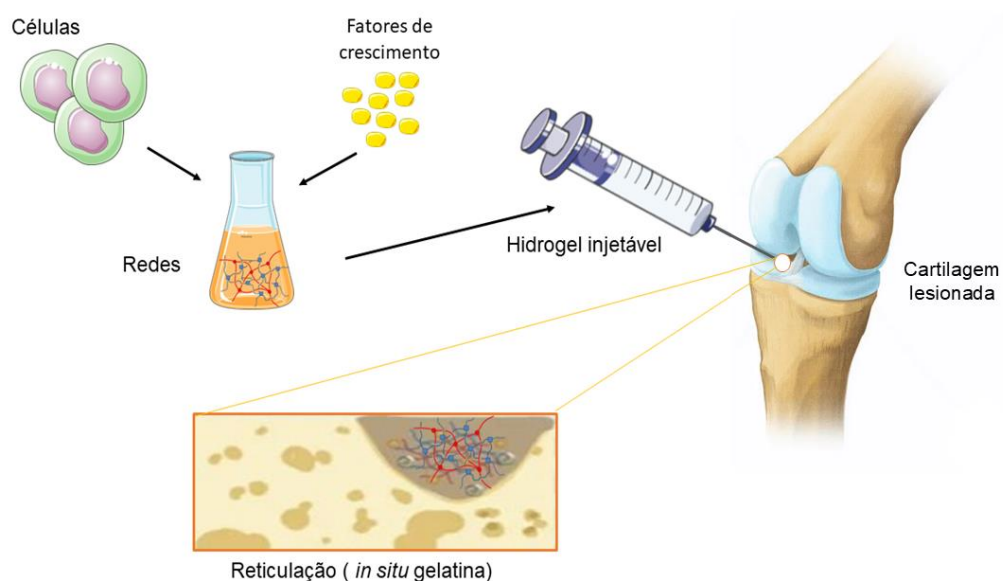


Figura 4. Diagrama esquemático da aplicação de hidrogel para reparo tecidual.
Fonte: Adaptado de TSANAKTSIDOU *et al.*, 2022.

Os hidrogéis podem ser divididos em duas categorias de acordo com o seu princípio de formação: reticulação física e reticulação química (YÁNEZ-VEGA; YÁNEZ-VEGA; BUSTAMANTE-TORRES, 2024). Os hidrogéis formados por reticulação física podem realizar uma transição reversível sem quaisquer catalisadores ou iniciadores, mas sua resistência mecânica é menor que a dos hidrogéis formados por reticulação química (YANG *et al.*, 2023). Os hidrogéis formados por reticulação química geralmente contêm um catalisador ou iniciador, que é difícil de eliminar e prejudica a biocompatibilidade dos materiais. Além disso, a síntese tradicional de hidrogel depende de métodos de reticulação não controlados, como a química radicalar (MOROZOVA, 2023).

Devido à semelhança entre as redes tridimensionais altamente hidratadas e os tecidos corporais, os hidrogéis têm sido amplamente utilizados nas áreas biomédicas. Os hidrogéis foram os primeiros biomateriais projetados para uso no corpo humano. (WEI *et al.*, 2009). Diversos polímeros biológicos, como alginato, gelatina, sulfato de condroitina, bem como polímeros sintéticos, foram utilizados com sucesso para desenvolver construções de engenharia de tecidos para o tratamento de articulações lesionadas. Em particular, um dos materiais que vem ganhando cada vez mais atenção para o desenvolvimento de construções de engenharia de tecidos para o tratamento da desse tecido é o ácido hialurônico (KIM *et al.*, 2022).

O HA é um composto orgânico, inicialmente isolado por Karl Mayer e John Palmer em 1934 a partir do humor vítreo do olho bovino. Mais tarde, em 1937, foi extraído pela primeira vez de fontes microbiológicas, como os estreptococos A e C (FALLACARA *et al.*, 2017, LUO *et al.*, 2023). No entanto, sua estrutura foi descrita apenas em 1970 por Laurent (ABATANGELO *et al.*, 2020). O HA é um polissacarídeo longo e não ramificado composto por dissacarídeos repetidos de ácido D-glucurônico e *N*-acetil-D-glucosamina (Figura- 5) com peso molecular (PM) atingindo até 20.000 kDa (CHEN; QIN; HU, 2019; TSANAKTSIDOU *et al.*, 2022). É um polissacarídeo do grupo dos glicosaminoglicanos que ocorre naturalmente como um componente da matriz intracelular na derme e também está presente no corpo humano como um sal de sódio denominado hialuronato de sódio (WEKWEJT *et al.*, 2024).

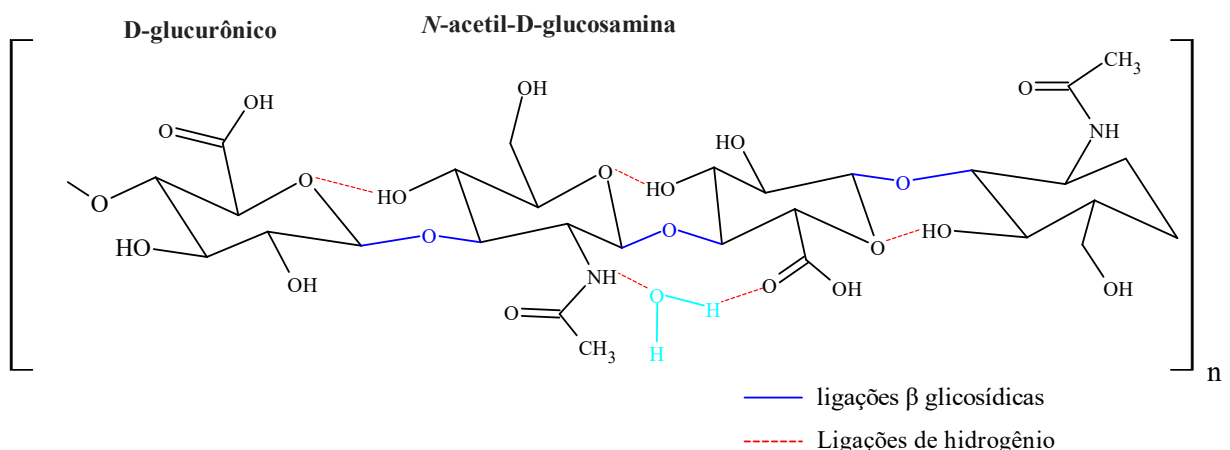


Figura 5. Fórmula estrutural do ácido hialurônico.

Fonte: elaborada pela própria autora.

O HA é um componente importante da matriz extracelular da pele (MEC) e desempenha um papel indispensável numa variedade de processos biológicos, possui

notável importância na resposta inflamatória, na angiogênese e no processo de regeneração tecidual (RAO, 2020) e capacidade de direcionamento para numerosas células como os macrófagos, células tumorais e condrócitos. Devido às suas propriedades físico-químicas, o HA hidrata a MEC e regula a homeostase dos tecidos e a resistência às forças de compressão. Além disso, o HA forma um revestimento pericelular ao redor da maioria das células, onde funciona como uma molécula sinalizadora interagindo com suas proteínas de ligação e regulando a adesão, migração e proliferação celular (ABATANGELO *et al.*, 2020). Ao contrário de outros glicosaminoglicanos, que são sintetizados no interior celular pelo aparelho de Golgi e posteriormente secretados por exocitose, o ácido hialurônico é sintetizado diretamente na membrana plasmática por três enzimas transmembrana: hialuronano sintetase 1 (HAS1), hialuronano sintetase 2 (HAS2) e hialuronano sintetase 3 (HAS3), conforme ilustrado na Figura 6 (ABATANGELO *et al.*, 2020; NAZERI; ARAM; NIAZI, 2024).

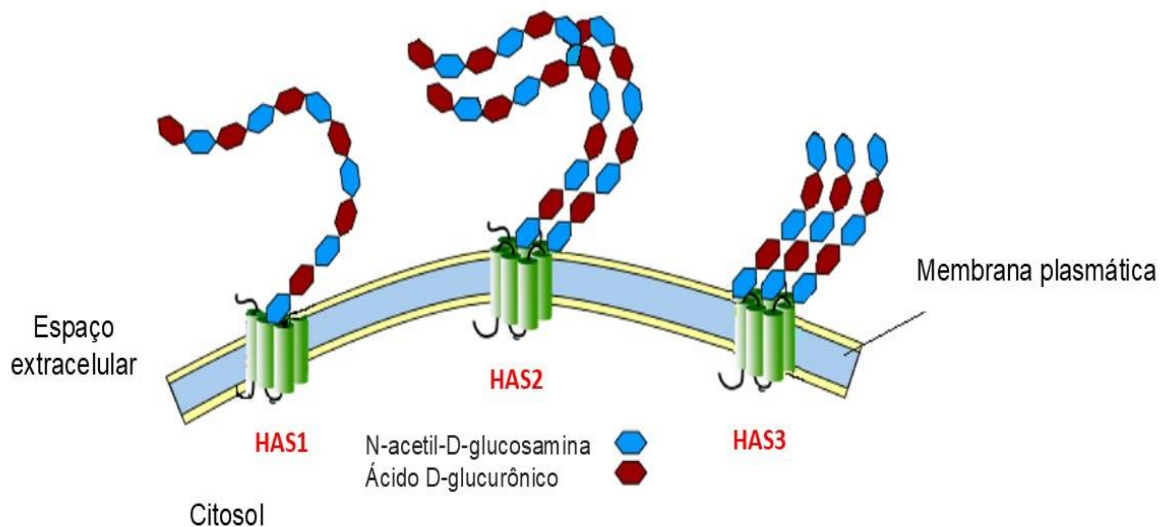


Figura 6. Ilustração da síntese do ácido hialurônico.
Fonte: NAZERI; ARAM; NIAZI, 2024.

Devido às suas propriedades viscoelásticas, atividade fisiológica, biocompatibilidade, biodegradabilidade, natureza hidrofílica e facilidade de modificação química, este material tem sido empregado na fabricação de diversos tipos de curativos para lesões, incluindo esponjas, filmes, hidrogéis e membranas eletrofiadas (GRAÇA *et al.*, 2020) *scaffolds*, formulações tópicas e nanoformulações (CORTES *et al.*, 2020), aplicações na regeneração de tecidos, medicamentos antienvhecimento e antiinflamatórios (VASVANI *et al.*, 2020). É essencial

compreender a química do HA, a subsequente modificação de grupos funcionais e várias técnicas de reticulação para preparar os hidrogéis para engenharia de tecidos (ABATANGELO *et al.*, 2020).

Tradicionalmente, o ácido hialurônico é extraído quimicamente de resíduos animais, como cristas de galo ou cordões umbilicais. No entanto, estes recursos são limitados e o HA desses tecidos está geralmente associado a proteoglicanos e frequentemente contaminados com enzimas degradantes que tornam o isolamento de HA de alta pureza e alto peso molecular muito difícil e muito caro. Além disso, o risco de vírus e agentes infecciosos entre espécies tem sido apontado ao usar animais para terapias humanas. Portanto, a produção microbiana está gradualmente substituindo a extração como o HA, devido ao menor custo de produção, purificação mais eficiente, menor poluição ambiental e maior rendimento em comparação com fontes animais (PAN *et al.*, 2017).

A forma linear natural das moléculas de ácido hialurônico é rapidamente degradada pela hialuronidase presente no organismo e, devido à sua meia-vida curta, pode ser insuficiente para proporcionar preenchimento satisfatório dos tecidos moles. É, portanto, necessário modificar as propriedades físicas e químicas para aumentar a resistência da molécula de HA à reabsorção. Para atingir esse objetivo, a polimerização do HA é aumentada por um processo de reticulação que adiciona uma molécula, ligando as cadeias poliméricas entre si (FUNDARÒ *et al.*, 2022) como demonstra a Figura 7.

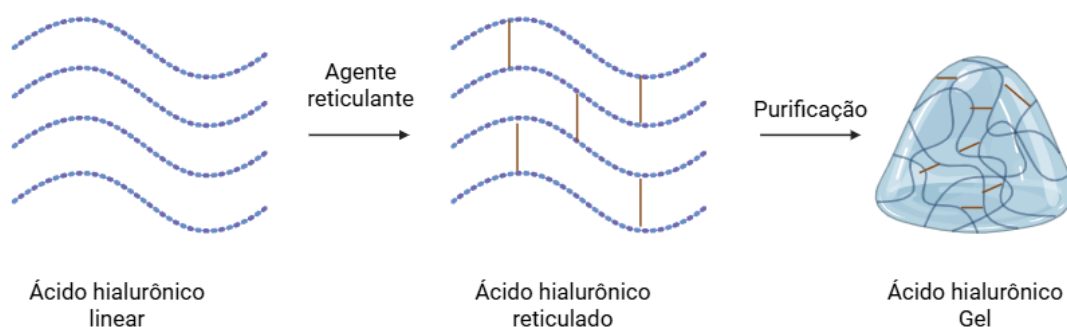


Figura 7. Diagrama esquemático da reticulação do ácido hialurônico.

Fonte: elaborada pela própria autora.

Em busca de reações ideais de preparação de hidrogéis, várias estratégias químicas têm sido empregadas (BERNE *et al.*, 2022, HEARN *et al.*, 2021). Nos últimos anos, a química clique ou “*Click Chemistry*”, devido à sua alta reatividade, excelente seletividade e condições de reação suaves, apareceu como uma estratégia eficaz para preparar hidrogéis com dimensões e padrões variados (ZHAO *et al.*, 2023). A reação Diels-Alder, em particular, tem se mostrado bastante promissora na reticulação de hidrogéis, na literatura podemos encontrar diversos estudos que têm explorado essa técnica, com destaque para estudos que utilizam furano-maleimida (GEVREK; SANYAL, 2021; CADAMURO; RUSSO; NICOTRA, 2021), possibilitando a formação de hidrogéis reticulados em um curto período de tempo (NIMMO; OWEN; SHOICHET, 2011).

2.3. *Click Chemistry* e a reação Diels-Alder

Nos últimos vinte anos, os campos da *click chemistry* têm apresentado um rápido crescimento. O termo foi cunhado pelo químico Karl Barry Sharpless em 2001, descrevendo reações altamente eficazes e confiáveis em condições aquosas. Estas permitem a rápida construção de diversidade estrutural e funcional, por meio da união de pequenos blocos de construção e gerando apenas subprodutos facilmente removíveis (POKORSKI; SMITH, 2018; TAIARIOL *et al.*, 2021; RODRÍGUEZ *et al.*, 2022; ZHAO *et al.*, 2023). Desde então, este conceito tem sido aprimorado, identificando um grande número de reações químicas que atendem a esses critérios, contribuindo significativamente para a descoberta de medicamentos e fornecendo valiosas ferramentas para o desenvolvimento de reações bi-ortogonais. A química bi-ortogonal, termo cunhado por Carolyn Bertozzi no final dos anos 90, refere-se a reações que ocorrem de forma rápida em condições biológicas. Essas condições incluem temperatura ambiente ou próxima a ela, soluções aquosas, moléculas biológicas e baixas concentrações. Nas células, encontramos diversas moléculas contendo diferentes grupos funcionais, essas reações são capazes de seletivamente interagir com um grupo funcional específico e são essenciais para elucidar o funcionamento de sistemas biológicos (IZQUIERDO; DELGADO, 2018).

As Reações *click chemistry* tem um vasto potencial de aplicação na ligação entre ácidos nucleicos, lipídios, proteínas e outras moléculas (TAKAYAMA; KUSAMORI; NISHIKAWA, 2019). Em reconhecimento a essas contribuições, o

Prêmio Nobel de Química de 2022 foi concedido aos professores Karl Barry Sharpless, Morten Meldal e Carolyn Bertozzi pelo desenvolvimento do conjunto de transformações químicas conhecido como "*Click Chemistry*" (BAUER *et al.*, 2023).

Este campo é dinâmico, gerando continuamente novas transformações. Muitos desses avanços estão predominantemente focados na bioconjugação e em aplicações na ciência dos materiais. Essas abordagens são amplamente utilizadas para projetar biomateriais poliméricos avançados para aplicações em engenharia de tecidos e medicina regenerativa, devido à sua biocompatibilidade e seletividade por grupos funcionais específicos, como os envolvidos na reação azida e alcino, a *click chemistry* não interfere em outros grupos químicos nem em processos biológicos (NWE; BRECHBIEL, 2009). Essa técnica também tem sido muito utilizada, na conjugação de anticorpos-fármacos, conjugados baseados em peptídeos e sistemas poliméricos (BATTIGELLI; ALMEIDA; SHUKLA, 2022). Essas novas moléculas híbridas são chamadas de bioconjugados e tornaram-se cruciais para o avanço da biologia química, biologia molecular, desenvolvimento de fármacos (CHOI *et al.*, 2020) e diagnósticos. Atualmente, são empregadas em uma ampla gama de aplicações, incluindo biotecnologia e medicina (SZIJJ *et al.*, 2020; XIE *et al.*, 2021).

Diversas reações químicas foram identificadas por atenderem os critérios da *click chemistry*. Uma das reações mais populares é a cicloadição de azida-alcino Huisgen catalisada por cobre (I) (CuAAC). No entanto, um ponto de preocupação com essa reação é a potencial toxicidade do catalisador de cobre (I), o que levanta questões no desenvolvimento de sistemas de entrega de medicamentos e biomateriais. Além disso, a presença de cobre (I) pode ser prejudicial para as células e biomoléculas como lipídios, ácidos nucleicos, polissacarídeos ou proteínas. Embora a cicloadição azida-alcino Huisgen também possa ser realizada na ausência de catalisadores metálicos, a taxa de reação é extremamente baixa à temperatura ambiente, limitando sua utilidade prática (GREGORITZA; BRANDL, 2015). Nesse contexto, há um interesse na busca por reações clique alternativas e isentas de metal. A cicloadição de Diels-Alder (DA) se destaca como uma dessas reações, pois não requer nenhum catalisador metálico. A reação Diels-Alder mantém sua eficiência, dispensando catalisadores, apresentando reatividade mesmo em temperatura ambiente (OLUWASANMI; HOSKINS, 2021). Deste modo tornou-se possível a formação de hidrogéis sem a necessidade de catalisadores potencialmente tóxicos (BAS; SANYAL; SANYAL, 2023).

A reação de Diels-Alder foi descrita pela primeira vez em 1928 por Otto Diels e Kurt Alder (NICOLAOU *et al.*, 2002). Seu trabalho na descoberta e desenvolvimento dessa reação rendeu-lhes, em conjunto, o Prêmio Nobel de Química em 1950. A reação de Diels-Alder (Figura- 8) é uma cicloadição reversível entre um dieno conjugado e um dienófilo (ANSARI; GHIASI; FORGHANIHA, 2019). A reação reversa, chamada retro Diels-Alder, pode reverter novamente para seu dieno e dienófilo originais, que podem então formar o cicloaduto novamente nas condições adequadas. Como tal, o dienófilo e o cicloaduto existem num equilíbrio determinado pelas suas condições atuais (OLUWASANMI; HOSKINS, 2021).

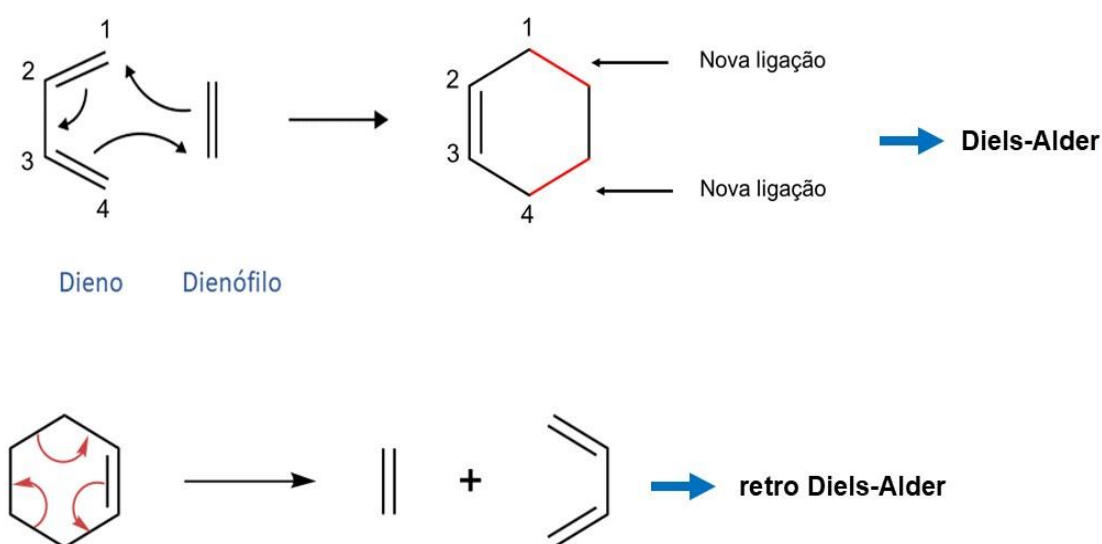


Figura 8. Reação de Diels-Alder e retro Diels-Alder.

Fonte: Adaptado de ANSARI; GHIASI; FORGHANIHA, 2019.

A reação DA desempenha um papel essencial na química orgânica, e sua importância para aplicações farmacêuticas e biomédicas está aumentando constantemente. Pares dieno-dienófilos adequados, por exemplo, furano e maleimida (Figura- 9) estão prontamente disponíveis e as moléculas de interesse podem ser facilmente funcionalizadas com os grupos reativos (RATWANI; KAMALI; ABDELKADER, 2023). Por exemplo, a introdução de unidades furânicas pode ser obtida pela reação de ácidos carboxílicos com álcool furfúrico ou furfurilamina. Da mesma maneira, as amins podem reagir com ácido 3-furóico ou ácido 3-(2-furil) propiônico. (GREGORITZA; BRANDL, 2015). O equilíbrio da reação de Diels-Alder é

controlado termicamente; temperaturas elevadas induzem a reação reversa e a reforma das porções maleimida e furano, enquanto temperaturas mais baixas favorecem a formação de aduto (GANDINI, 2013; KOEHLER; ANSETH; BOWMAN, 2013).

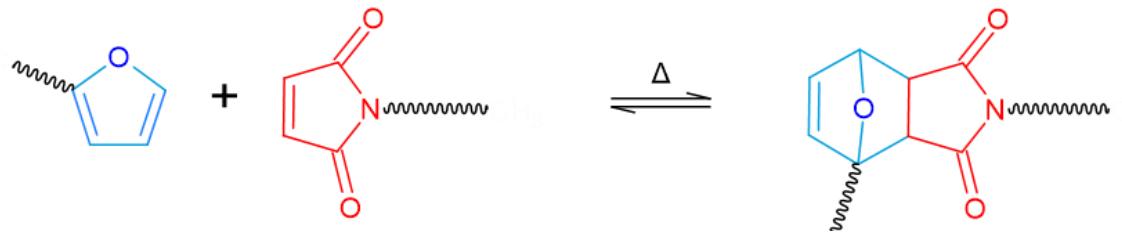


Figura 9. Reação de Diels Alder envolvendo furano e maleimida.
Fonte: elaborada pela própria autora.

2.4. Compostos Furânicos

Desde o final do século XX, houve um avanço na conversão de derivados de furano, que são recursos abundantes e não comestíveis, em produtos químicos de alto valor agregado. Esses produtos incluem biocombustíveis, monômeros de polímeros de uso geral e novos polímeros (TACHIBANA; KASUY, 2023). A biomassa vegetal, predominantemente resíduos agrícolas não comestíveis, constitui a fonte essencial de furanos para polímeros por meio de polissacarídeos pentose e hexose, que podem ser convertidos, respectivamente, em furfural (F), bem como em seu homólogo 5-metil e hidroximetilfurfural (HMF). A produção industrial de furfural tem mais de um século e explorou numerosos resíduos ricos em pentoses, incluindo bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz e de aveia, sementes de algodão, cascas de azeitona e lascas de madeira (GANDINI; BELGACEM, 2008; TONG; MA, 2010) dependendo da disponibilidade local e geográfica, com uma produção anual atual superior a 200.000 toneladas (GANDINI; LACERDA, 2022).

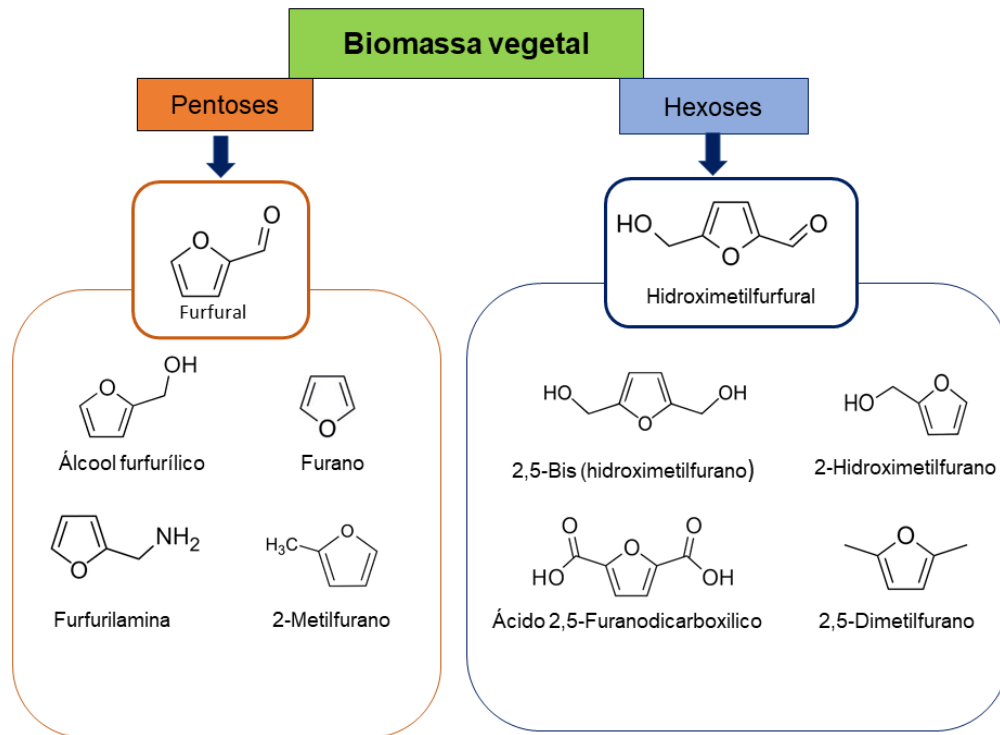


Figura 10. Compostos furânicos derivados de furfural e hidroximetilfurfural.

Fonte: Adaptado de ANTUNES *et al.*, 2022.

Segundo a European Biomass Industry Association (EUBIA), aproximadamente 75% da biomassa vegetal consiste em carboidratos, mas o alto teor de oxigênio dificulta sua utilização direta na indústria química e na engenharia energética. A celulose, a forma predominante de carboidrato na biomassa (60%-80%), é pouco solúvel e não pode ser facilmente utilizada em processos e dispositivos químicos modernos. Por isso, é necessário converter a biomassa em materiais com menor teor de oxigênio, adequados para aplicação na indústria química, engenharia energética e transportes (TURSI, 2019).

O desenvolvimento de métodos eficazes para processar biomassa em produtos químicos valiosos é uma prioridade na química e engenharia química modernas. Uma abordagem em desenvolvimento para o processamento da biomassa envolve a desidratação de carboidratos em derivados de furano, em particular, 5-hidroximetilfurfural (HMF), que é considerado um reagente chave, um chamado produto químico de plataforma, para a síntese de diversos produtos praticamente valiosos, incluindo polímeros, produtos farmacêuticos, solventes e combustíveis. Em 2014, entrou em operação a primeira fabricação industrial de HMF baseada na

desidratação de frutose catalisada por ácido (CHERNYSHEV; KRAVCHENKO; ANANIKOV, 2017).

As principais vias sintéticas para o HMF baseiam-se na desidratação das hexoses catalisadas por ácido ou metal. Monossacarídeos (glicose e frutose), dissacarídeos (sacarose) e polissacarídeos (amido e celulose), são usados como matéria-prima de hexose. Na maioria das publicações, a síntese de HMF a partir de polissacarídeos é iniciada com a hidrólise de polissacarídeos em glicose e/ou frutose como ilustra a Figura 11 (KASHPAROVA *et al.*, 2021). A glicose isomeriza-se reversivelmente em frutose, que então perde três moléculas de água para resultar em HMF (CHERNYSHEV; KRAVCHENKO; ANANIKOV, 2017).

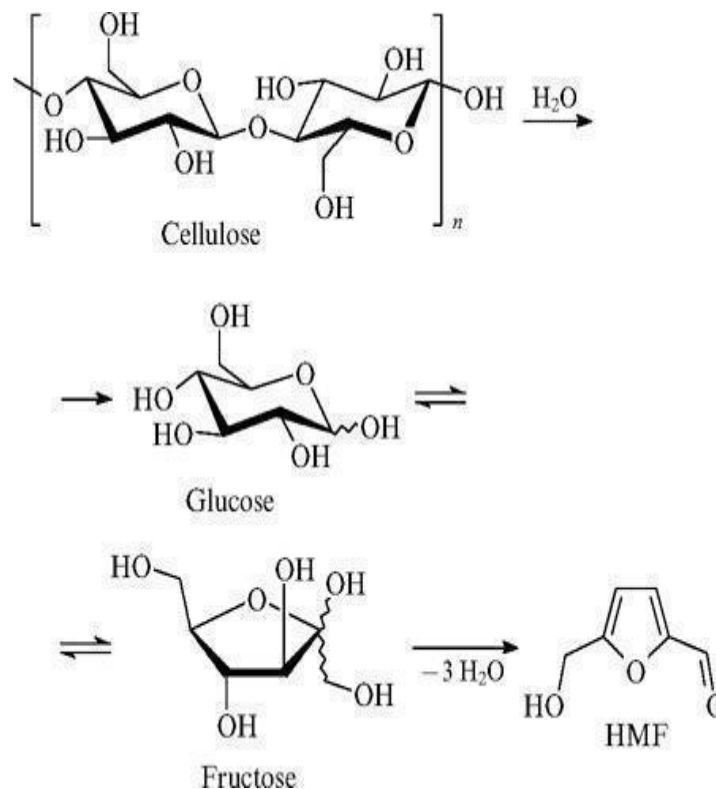


Figura 11. Esquema da síntese de 5-hidroximetilfurfural a partir da celulose.
Fonte: KASHPAROVA *et al.*, 2021.

O interesse na utilização de compostos derivados de furano tem crescido exponencialmente, pelo potencial de produção em larga escala a partir de açúcares, que podem ser obtidos a partir de biomassa, como uma alternativa promissora de base biológica (ELDEEB; AKIH-KUMGEH, 2018). Além disso, o componente de

sustentabilidade desses compostos também contribui para o aumento desse interesse (GANDINI; BELGACEM, 2008).

2.5. Bismaleimida

Os monômeros de bismaleimida (BM) são moléculas que são terminadas por dois grupos funcionais maleimida ligados por uma ligação carbono-carbono (Figura-12) os grupos maleimida consistem em uma estrutura cíclica com um grupo amida (NH) e um grupo carbonila (CO) (LIANG *et al.*, 2024). As BMs são derivadas de diversas fontes, por meio da reação entre o anidrido maleico e uma amina primária, incorporando diaminas em sua estrutura (IREDALE; WARD; HAMERTON, 2017). Comumente empregadas na indústria, atuam como agentes de reticulação em polímeros termorrígidos, melhorando suas propriedades mecânicas e térmicas. Esta estabilidade térmica é particularmente vantajosa em engenharia de polímeros, onde a resistência ao calor e a estabilidade dimensional são cruciais (KIRMANI *et al.*, 2020).

O interesse por bismaleimidadas, tanto do ponto de vista científico quanto técnico, cresceu ao longo da década de 1980. As primeiras bismaleimidadas eram chamadas de "bismaleimidadas de primeira geração". Embora esses materiais apresentassem alta estabilidade térmica e rendimentos sintéticos elevados, eram considerados frágeis em termos mecânicos. As bismaleimidadas de "segunda geração" foram desenvolvidas com foco na superação dessas limitações, apresentando maior tenacidade, melhor desempenho em altas temperaturas e maior facilidade de processamento. Além disso, esses novos sistemas mantinham o custo relativamente baixo e boa disponibilidade dos monômeros utilizados (IREDALE; WARD; HAMERTON, 2017; LU *et al.*, 2024).

As BMs fazem parte da família de polímeros termofixos de alto desempenho, apresentando uma série de propriedades atrativas para aplicações industriais. Além da alta resistência térmica previamente mencionada, as bismaleimidadas também se destacam por sua estabilidade química e baixa viscosidade. Essas características tornam ideais para uma variedade de usos industriais, incluindo processos de moldagem por injeção (XIONG *et al.*, 2023).

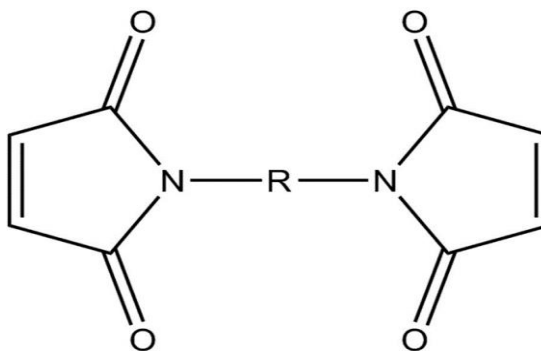


Figura 12. Estrutura geral de um monômero de bismaleimida.

Fonte: IREDALE; WARD; HAMERTON, 2017.

Pelas propriedades mencionadas acima, as BM também têm sido estudadas para uso em medicina, como agentes reticulantes de materiais injetáveis, como hidrogéis (OCANDO *et al.*, 2021). Em alguns trabalhos foram destacados que a utilização de bismaleimida para criar polímeros e moléculas conjugadas é um campo de pesquisa em constante desenvolvimento. As bismaleimidas são precursores úteis para reações de Diels-Alder, adições de Michael e conjugação baseada em tiol-maleimida para a síntese de materiais e polímeros (RAO *et al.*, 2013; TROMBINO *et al.*, 2019; MULJANA *et al.*, 2022).

Atualmente, algumas bismaleimidas (BM) estão disponíveis no mercado, incluindo 1, 1'-(4-metil-1,3-fenileno) bismaleimida, BMOE (bis-maleimidoetano), BM(PEG)₂ (1,8-bismaleimida-dietilenoglicol) e BM(PEG)₃ (1,11-bismaleimido-trietilenoglicol). No entanto, um grande desafio é a solubilidade aquosa dessas moléculas, já que a maioria não é solúvel, o que limita seu uso em ambientes fisiológicos. Tendo em vista essa aplicação, é de extrema importância que a bismaleimida utilizada em meio fisiológico tenha uma origem natural e renovável e sejam solúveis em meio aquoso (IREDALE; WARD; HAMERTON, 2017). Neste trabalho foi proposto a síntese de uma bismaleimida.

Neste trabalho, foi sintetizado uma bismaleimida solúvel em água. As informações contidas nas páginas 40, 41, 49, 50 e 52 foram omitidas, pois os dados correspondentes estão atualmente em processo de solicitação de patente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

O hialuronato de sódio seco (1,9 A 2,2 MDA – Sinovial) foi adquirido da DMC São Carlos, a furfurilamina foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) foram adquiridos da Chem-Impex Int'L Inc (Wood Dale, Illinois, EUA), o ácido clorídrico (HCl) e o hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil), as membranas de diálise foram adquiridas da Sigma-Aldrich (USA), aduto furano anidrido maleico (sintetizado previamente de acordo com metodologia já utilizada pelo grupo). dimetilsulfóxido (DMSO) ambos da Êxodo Científica (São Paulo, Brasil), água destilada, óxido de deutério (D₂O), DMSO deuterado e corante Azul de Tripán foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

3.2. Síntese de ácido hialurônico com furfurilamina (HA-Furano)

Para a enxertia do grupamento furânico, os derivados de HA modificados por furano (HA-furano) foram sintetizados pela dissolução de HA (0,5 g) em 90 mL de água destilada ao qual o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida foi adicionado (0,18 g), e agitada durante 20 min em temperatura de 40°C. A furfurilamina foi então adicionada gota a gota (250 µL), em seguida foi adicionado N-hidroxisuccinimida (0,2 g). O EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) ativa grupos carboxila formando um intermediário reativo, enquanto NHS (N-hidroxissuccinimida) ou sulfo-NHS estabiliza esse intermediário e aumenta a eficiência de acoplamento com aminas primárias (COFFMAN *et al.*, 2018). A reação foi conduzida à temperatura 40 °C por 3h. A suspensão foi então purificada por meio de diálise com água destilada por 7 dias, para remoção de sais e excessos de reagente. A água foi removida por liofilização para obter derivados HA-furano. O grau de substituição será determinado por titulação condutimétrica convencional. O esquema da reação é apresentado resumidamente na Figura 13-A e 13-B.

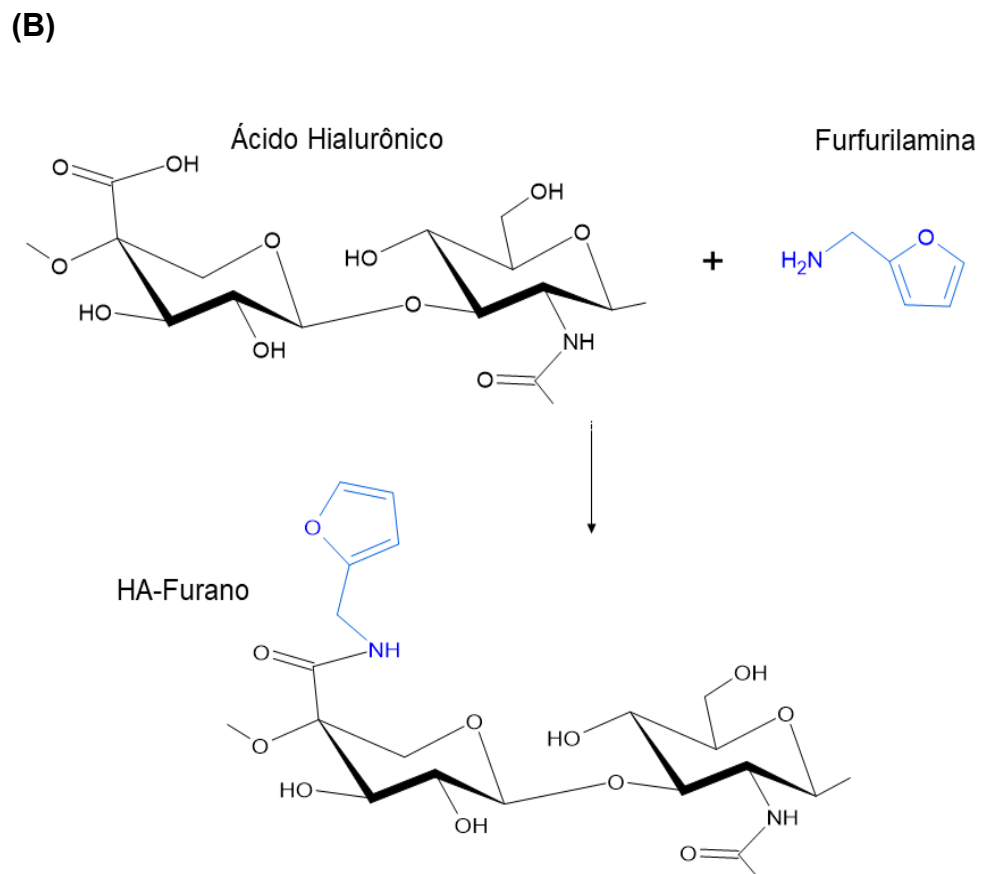
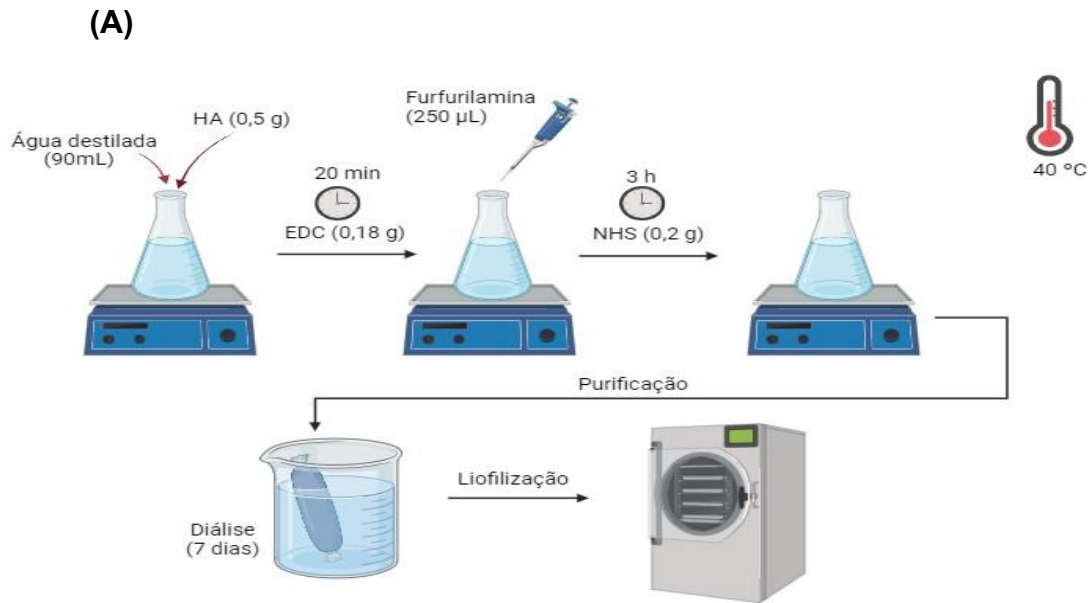


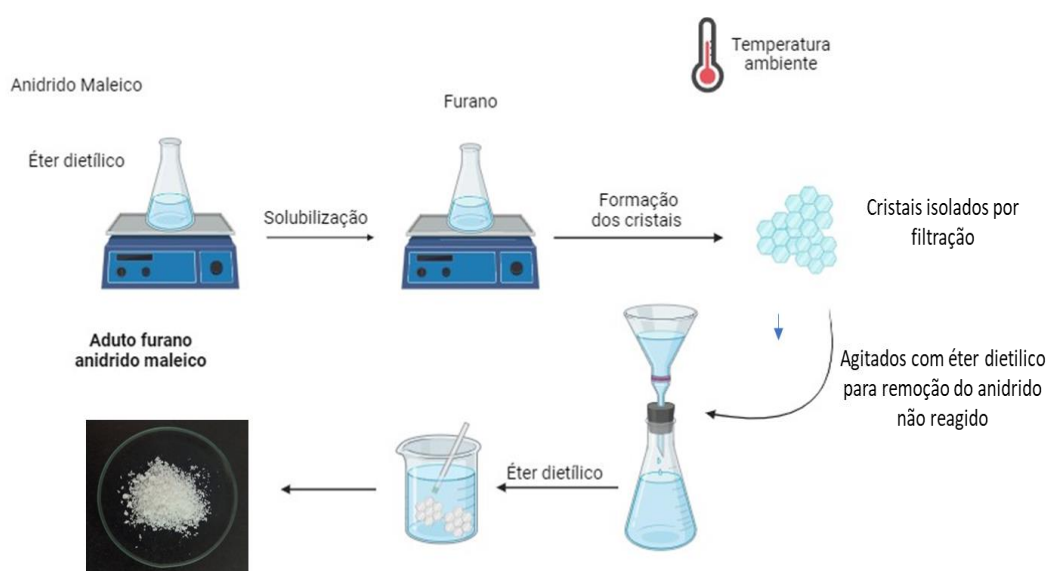
Figura 13. Esquema da síntese do ácido hialurônico modificado com a furfurilamina (a) e reação de enxertia do furano na superfície do ácido hialurônico através da ligação entre o grupamento carboxílico presente na molécula de ácido hialurônico com a amina presente na furfurilamina (b).

Fonte: elaborado pela própria autora.

3.3. Síntese do aduto furano anidrido maleico

Em um balão de fundo redondo foi adicionado 4,9 g de anidrido maleico e 30 mL de éter dietílico, os quais foram agitados em temperatura ambiente até completa solubilização. Em seguida, foi adicionado 3,4 g de furano e a solução foi mantida em agitação até formação de cristais brancos, indicando sucesso da formação do aduto furano anidrido maleico, toda reação foi conduzida em atmosfera de nitrogênio. Os cristais foram isolados por filtração e agitados com éter dietílico para remover o anidrido maleico não reagido.

(A)



(B)

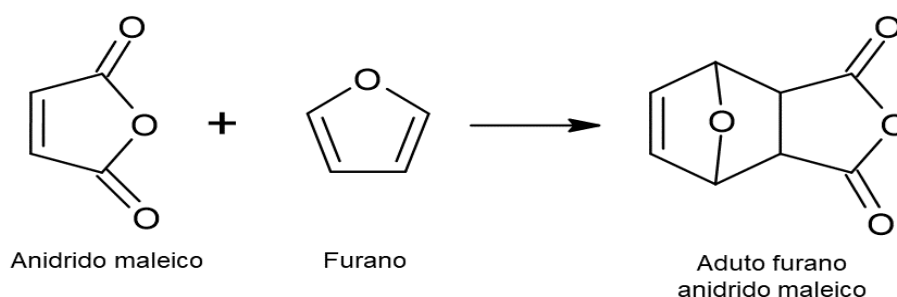


Figura 14. Esquema da síntese de aduto furano anidrido maleico (a) e estrutura química do anidrido maleico, furano e a formação do aduto furano anidrido maleico (b).

Fonte: elaborado pela própria autora.

3.4. Síntese de bismaleimida solúvel em água

Figura 15. Esquema da síntese de bismaleimida.
Fonte: elaborada pela própria autora.

3.5. Reticulação do ácido hialurônico modificado e bismaleimida por reação Diels-Alder

Para o estudo da reticulação, o ácido hialurônico modificado com a furfurilamina foi misturado com a bismaleimida em proporção molar de dois furanos para uma bismaleimida (2:1), conforme ilustrado no esquema da Figura 16. A primeira análise foi a observação visual da mistura, buscando o aumento da viscosidade até a formação do hidrogel, sem fluidez.

Após a obtenção do ácido hialurônico modificado com furano e da BM-Lis, procedeu-se à reticulação desses materiais. Pesou-se, em uma balança analítica, 12 mg de HA modificado e 6 mg de BM-Lis (amostras secas). O HA-Furano foi solubilizado em 1 mL de água destilada, após total solubilização da amostra, foi dividida em dois microtubos de centrifuga de 2 mL contendo 0,5 mL de amostra em cada tubo. Então, verteu-se a solução de BM-Lis na solução de HA-Furano em um dos tubos e agitou-se suavemente o tubo de forma manual para que houvesse a mistura dos materiais e em seguida a amostra ficou em banho maria a 37 °C, a reação ocorreu em aproximadamente 1 minuto. A amostra do segundo tubo foi usada como controle. Realizou-se o procedimento descrito anteriormente utilizando uma segunda bismaleimida derivada do Polietilenoglicol (PEG) fornecida de maneira generosa pelo Dr. Ricardo Kramer. Essa bismaleimida foi sintetizada durante sua pesquisa de doutorado na EESC-USP (KRAMER *et al.*, 2019). Neste estudo, optou-se por denominar essa bismaleimida como BM-PEG. Ensaio reológico foram realizados posteriormente para determinação precisa das características reológicas do HA não reticulado e reticulado.

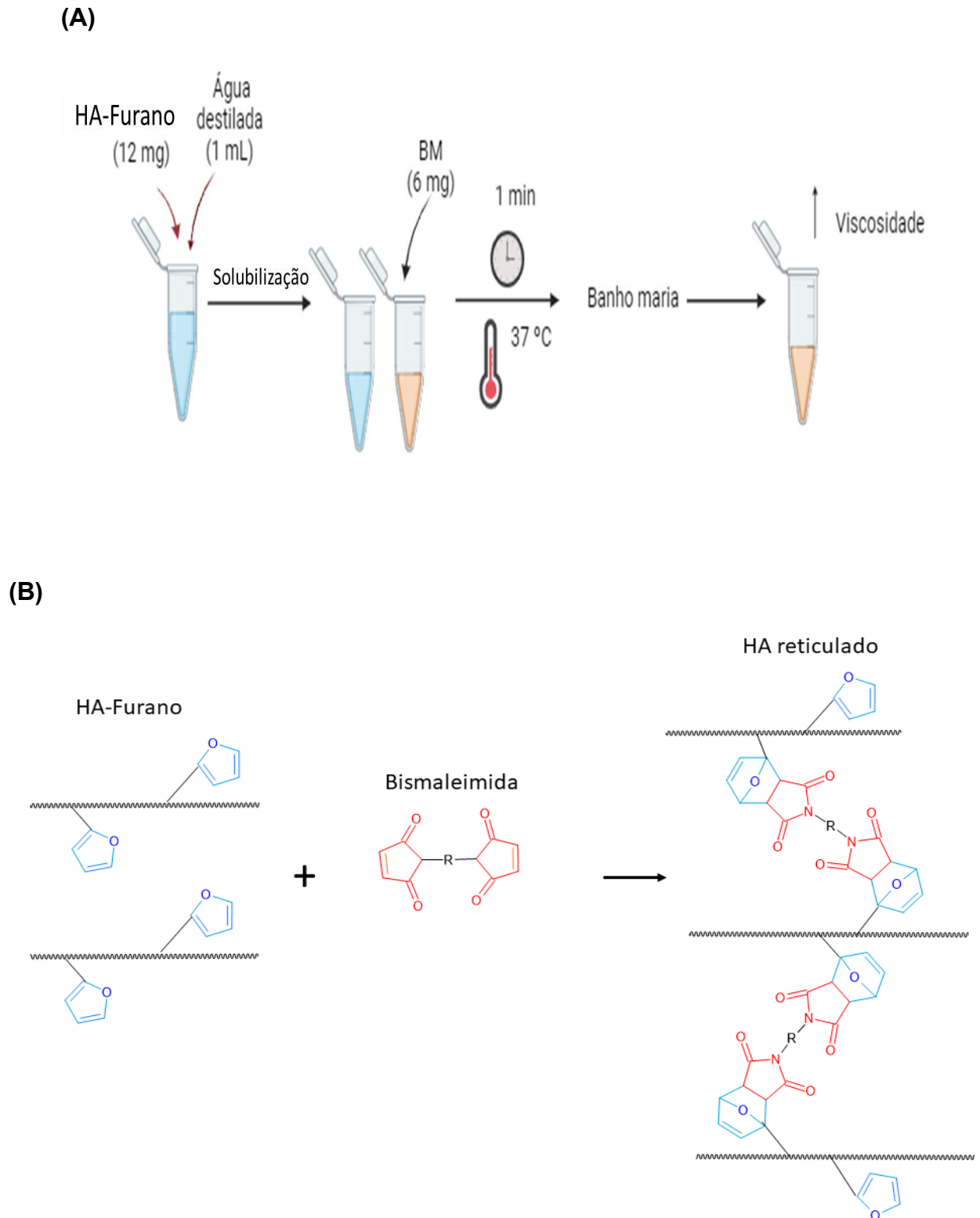


Figura 16. Esquema da reticulação do ácido hialurônico com a bismaleimida (a) e estruturas químicas das moléculas de HA-Furano, BM e do HÁ reticulado (b).
Fonte: elaborada pela própria autora.

3.6. CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

3.6.1. Titulação condutimétrica

A quantidade de grupamentos carboxílicos dos materiais, antes e após as reações de modificação do ácido hialurônico com a furfurilamina, foi determinada por meio de titulação condutimétrica ácido/base. A titulação condutimétrica foi realizada em condutivímetro (Analyser® 650M). Adicionou-se 0,01 g das amostras de HA e HA modificado com furfurilamina, em um Becker com 2 mL de água destilada, homogeneizou por 5 minutos a 100 rpm o pH da suspensão foi então ajustado para 2,5 por meio da adição de HCl 0,1 M em pHmetro (Kasvi®). O material foi então titulado com NaOH 0,1 M, adicionado em alíquotas de aproximadamente 10 µL em intervalos de 20 segundos sob agitação magnética a 380 rpm, anotou-se os resultados para realização dos cálculos para quantificação dos grupamentos carboxílicos nas amostras, conforme Equação 1.

$$X = [C \cdot (V_2 - V_1)] / w$$

Onde: C é a concentração do titulante, W é a massa da amostra e V_1 e V_2 são os volumes equivalentes em L.

3.6.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de aduto furano anidrido maleico, lisina, BM-Lis, HA, HA-Furano, HA-Furano-BM-Lis e HA-Furano-BM-PEG foram analisadas em um Espectrômetro Perkin-Elmer Spectrum 100 FTIR equipado com um dispositivo de refletância total atenuada (ATR) de diamante revestido com cristal de seleneto de zinco. Os espectros foram feitos na faixa de 650 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , 16 varreduras de espectro e as saídas espectrais foram registradas em transmitância.

3.6.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ^1H NMR foram obtidos em um equipamento Bruker Avance II HD, a 600 MHz. Os parâmetros utilizados foram: tempo de repetição: 11 s, largura de

pulso: 90°; recycle delay: 500 ms; tempo de aquisição: 3.9 s; 16 varreduras, largura espectral: 6.4 e lb.: 1. As amostras de HA, HA-Furano, HA-Furano-BM-Lis, HA-Furano-BM-PEG, lisina e BM-Lis foram solubilizadas em D₂O a 1 % de concentração (p/v), enquanto a amostra de aduto furano anidrido maleico foi solubilizada em DMSO deuterado, na mesma concentração das amostras anteriores.

3.6.4. Análise Térmica

O comportamento de decomposição térmica foi estimado utilizando análise termogravimétrica (TGA55, TA Instruments) a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 500 °C. As propriedades térmicas foram investigadas por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) usando um DSC250, TA Instruments. As amostras foram condicionadas a 40 °C por 24 horas antes do teste. Amostras secas (6 mg) foram inseridas na panela de alumínio e os testes foram realizados sob fluxo de nitrogênio (50 mL/min), a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min., partindo de 25 °C até 400 °C.

3.6.5. Análise Reológica

Os parâmetros reológicos foram determinados em Modular Compact Rheometer - MCR 92 (Anton Paar® GmbH, Graz, Austria). Os testes foram conduzidos a 25 °C, usando uma placa geometria com 25 mm de diâmetro em um espaço de 0,2 mm. Para as análises reológicas foram utilizados 300 µL de cada amostra HA, HA-Furano, HA-Furano-BM-Lis e HA-Furano-BM-PEG. As amostras de HA reticulado foram preparadas como descrito no item 3.5. No entanto, essa concentração foi utilizada apenas nos ensaios de viscosidade e taxa de cisalhamento, pois nas demais análises, não foi possível a leitura das amostras devido às suas características (viscosidade). Para os demais testes reológicos, foram utilizados 10 mg de HA-Furano e 5 mg de BM, os quais foram adicionados sobre a superfície da placa de leitura, sendo removido o excesso de amostra. Para determinação de viscosidade, foram realizadas medidas na faixa de taxa de cisalhamento de 1 a 1000 s⁻¹. Enquanto os testes de varredura de amplitude foram realizados a uma frequência angular constante de 10 rad. s⁻¹, com a deformação por cisalhamento variando de 0,01 a 1000 %.

3.6.6. Ensaio de Reticulação

As amostras foram secas em estufa a 45 °C até a massa constante. A massa foi determinada em balança analítica com precisão de quatro casas decimais. Esta massa foi considerada a massa total inicial das amostras. As amostras secas de HA, HA-Furano e HA-Furano-BM-Lis e HA-Furano-BM-PEG (10 mg) foram transferida para tubos de 15 mL, onde foram adicionados 3 mL de água destilada e este foi acondicionado a 30 °C por 24 horas. Após este período, a amostra foi centrifugada (4 minutos, 1700 g), o polímero foi ressuspendido em água e novamente centrifugado (4 minutos, 1700 g). O tubo contendo o polímero foi levado à estufa a 50 °C até a secagem e massa constante da amostra (massa final). A massa total inicial foi considerada 100 %. O cálculo da porcentagem de reticulação considerou a massa final em relação à massa inicial, conforme equação 2:

$$\% \text{ reticulação} = (M_f \times 100) / M_i$$

M_f : Massa final M_i : Massa inicial

3.6.7. Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi investigada utilizando o método padrão de redução de resazurina, utilizando células de fibroblastos de camundongo L929. A cultura celular foi mantida a 37 ± 2 °C em atmosfera de 5 % de CO₂ até atingir 80-90 % de confluência e depois tripsinizada. A suspensão celular foi centrifugada por 5 min a 1200 x g e 0,1 mL (1 x 10⁵ células) foram semeadas em uma placa de 96 poços e incubadas por 24 horas a 37 ± 2 °C em atmosfera de 5 % de CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi substituído pelo meio de cultura com amostras de HA, HA-Furano, HA-Furano-BM-Lis, HA-Furano-BM-PEG na concentração de 2 mg/mL, já as amostras de furfurilamina, BM-Lis e BM-PEG realizou-se uma diluição seriada a partir da concentração de 2 mg/mL até 0,015 mg/mL. O meio de cultura foi utilizado como controle negativo (para garantir o crescimento celular livre da amostra) e o controle positivo foi DMSO a 10 % (vol) em meio de cultura. Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS. Solução de resazurina (10 % vol em meio suplementado com DMEM) foi adicionada a cada poço e as microplacas foram incubadas a 37 ± 2 °C durante 4 h em atmosfera de 5 % de CO₂. 100 µL de

cada amostra foram transferidos para a microplaca de 96 poços. A fluorescência foi lida em comprimentos de onda de excitação de 570 nm e emissão de 590 nm em um leitor de microplacas (CaryEclipse Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). A viabilidade celular foi relatada como % de viabilidade em comparação com a amostra de controle, utilizando o software Excel para plotagem. Os resultados são apresentados como valores médios e desvio padrão.

3.6.8. Viabilidade Celular Após a Extrusão do Hidrogel

Para avaliar a viabilidade celular após a passagem do hidrogel por agulha hipodérmica, foram preparadas quatro formulações: HA, HA-Furano, HA-Furano-BM-Lis e HA-Furano-BM-PEG. Inicialmente, cada amostra foi dissolvida em tampão PBS na concentração de 6 mg/mL, garantindo completa solubilização do material. Em seguida, a cada amostra solubilizada foram adicionados 80 µL de meio de cultura contendo fibroblastos de camundongo L929 (1×10^5 células), previamente cultivadas conforme descrito no item 4.6.7. A mistura resultante foi cuidadosamente homogeneizada para assegurar a dispersão uniforme das células no hidrogel. Posteriormente, com o auxílio de uma pipeta, as amostras foram transferidas para seringas de 3 mL e acopladas a agulhas hipodérmicas de 40 × 1,20 mm. O material contendo células foi extrusado lentamente, simulando a injeção em condições clínicas. A viabilidade celular foi avaliada imediatamente após a injeção, utilizando o corante azul de tripan para distinção entre células viáveis e inviáveis. A leitura dos resultados foi realizada em contador automatizado (Bio-Rad TC20™).

3.6.9. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa BioEstat 5.3, por meio da análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para as análises que apresentaram o valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Titulação Condutimétrica

A quantidade de grupamentos carboxílicos dos materiais (ácido hialurônico e HA-Furano) foi determinada por meio de titulação condutimétrica ácido/base (Figura-17). A partir da análise gráfica é possível visualizar que na amostra de ácido hialurônico, há presença de COOH. Já na amostra de HA modificado, há uma quantidade menor de grupamentos carboxílicos, o que era esperado uma vez que a etapa de modificação do HA por furfurilamina substitui hidroxilas (OH) por grupamentos furânicos, tendo então sucesso na modificação. Para confirmação da análise gráfica, foi realizado o cálculo (Equação- 1) 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 ácido hialurônico 1,25 mmols/g e 0,75 mmols/g para o ácido hialurônico modificado com furfurilamina, sendo possível determinar que o grau de substituição foi aproximadamente de 0,5 mmols/g, correspondendo a uma substituição de 40%.

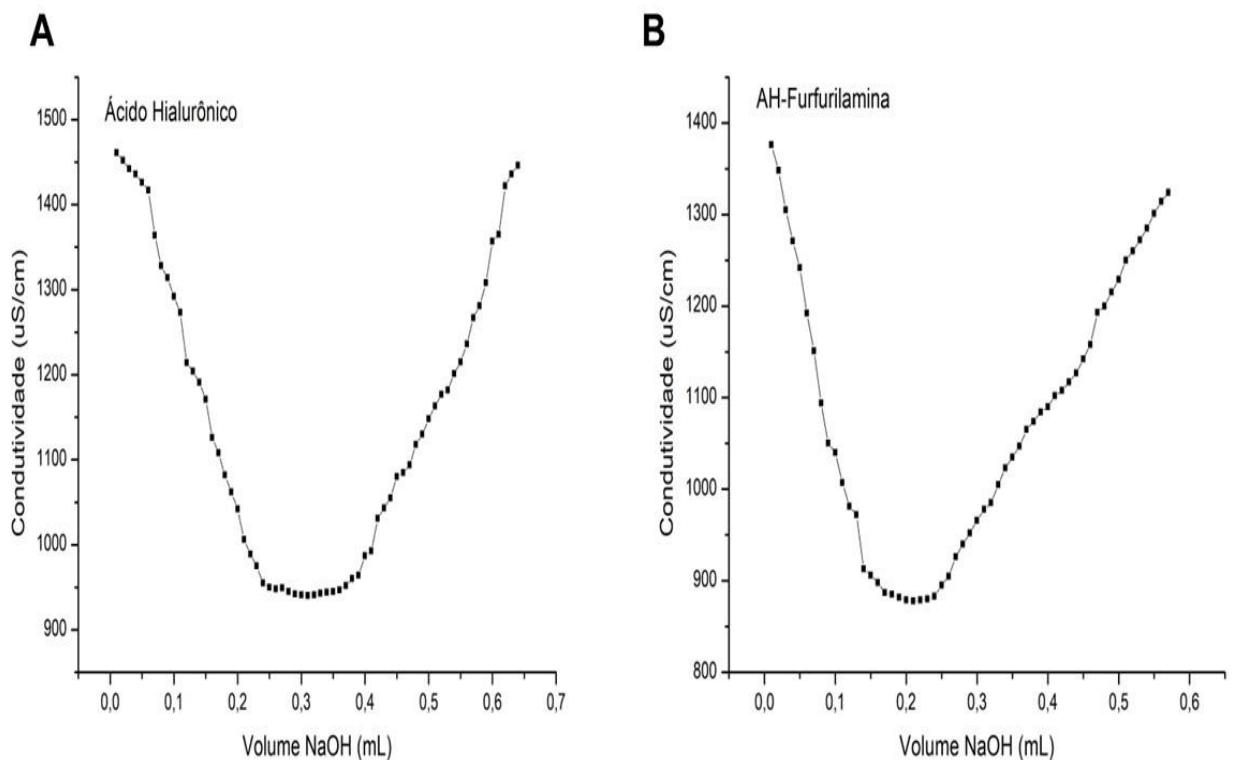


Figura 17. Titulação condutimétrica das amostras de ácido hialurônico (a) e de ácido hialurônico modificado com furfurilamina (b)

Fonte: elaborada pela própria autora.

4.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia infravermelha é uma ferramenta instrumental extremamente importante nas ciências aplicadas e básicas para a determinação de vários grupos funcionais e compostos orgânicos porque examina as transições entre estados vibracionais de ligações dentro da molécula (KHAN *et al.*, 2018). Na Figura 18 está representado os espectros de FTIR das amostras de HA, furfurilamina e HA-Furano. O espectro do HA mostrou picos característicos de HA, como vibração de estiramento –OH e vibração simétrica –NH em 3300 cm^{-1} na cadeia lateral de N-acetil e amida I carbonila (C=O) em 1602 cm^{-1} (PARK *et al.*, 2014). Uma banda em 1405 cm^{-1} corresponde a vibração de deformação C–O–H. As bandas éter foram atribuídas em 1115 e 1135 cm^{-1} (ANTUNES *et al.*, 2010; CARNEIRO *et al.*, 2016).

No espectro FTIR da furfurilamina é possível observar uma banda na região 3300 cm^{-1} correspondente ao grupo amina primária (-NH₂) apresentando um pico de absorção devido às vibrações de estiramento de NH. As bandas de alongamento CH são observadas em torno de 3000 cm^{-1} , abrangendo tanto as regiões alifáticas quanto aromáticas da molécula. Na região de 1600 cm^{-1} está presente o pico característico de alongamento de C=C de anéis aromáticos, esses picos são devido à presença do anel furano na estrutura da furfurilamina. Em 1200 cm^{-1} é observado o pico relacionado ao alongamento CN, indicativo da presença do grupo funcional amina. Além disso, as bandas de flexão CH foram detectadas na região de 1450 cm^{-1} . O HA-Furano apresentou as bandas típicas do HA quanto da furfurilamina, conforme esperado, e as mudanças no espectro que indicam o sucesso da reação. No espectro do HA foi observado um pico em 1602 cm^{-1} associado ao estiramento C=O do ânion carboxilato (MANJU; SREENIVASAN, 2011). No entanto, esse pico desaparece após a formação do conjugado, é possível notar um pico na região 1740 cm^{-1} associado ao C=O. Além disso, em 890 cm^{-1} , destaca-se a característica banda de vibração da ligação C=C do furano, enquanto a presença de ligação C-N em 1200 cm^{-1} , indica a reação entre o grupo carboxílico do HA com o grupo amina da furfurilamina indicando que nessa região ocorreu a reação.

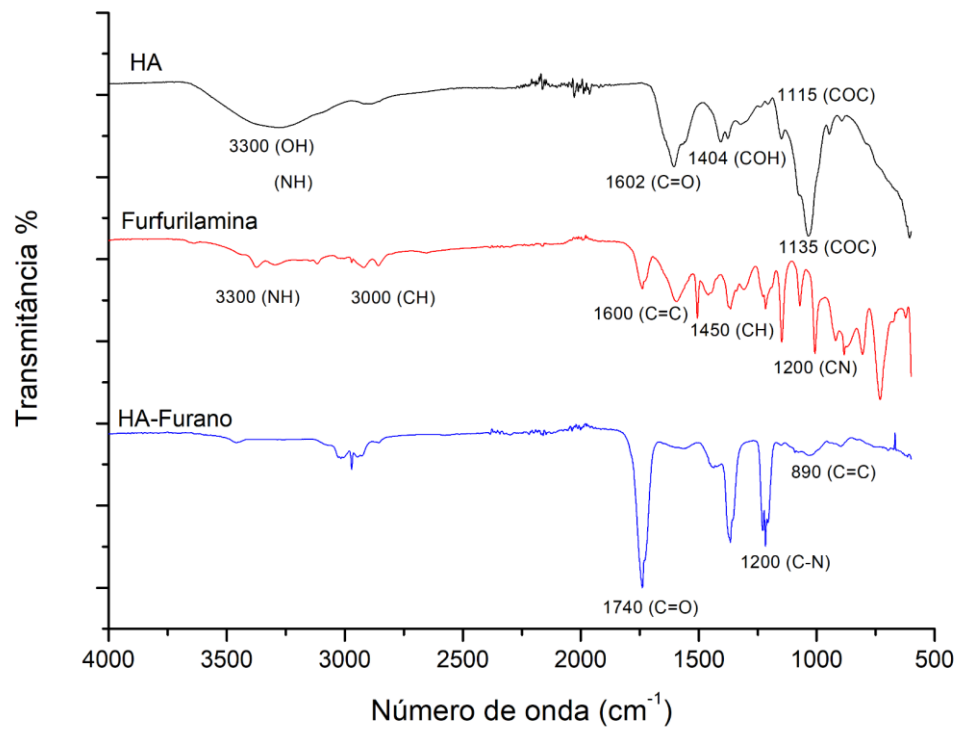


Figura 18. FTIR das amostras de Ácido Hialurônico, Furfurilamina e HA-Furano.
Fonte: elaborada pela própria autora.

4.3. Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H RMN)

Neste estudo, usamos a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H RMN) em amostras de HA para confirmar a reação e a incorporação do grupamento furano na molécula de HA. Além disso, a mesma técnica foi aplicada em amostras de bismaleimida que foram sintetizadas a partir do aminoácido lisina, para confirmar a ocorrência da reação. Por fim, foi feita a análise do HA-furano reticulado com BM-PEG e BM-Lis.

Na Figura 20 estão representados os espectros de ^1H RMN do Ácido hialurônico (vermelho) e do ácido hialurônico modificado com furfurilamina (azul), O HA-Furano foi obtido ligando a furfurilamina ao HA. O espectro correspondente ao HA não modificado mostra um pico localizado a 2,0 ppm, que pode ser atribuído aos prótons do grupo metil no HA grupo N-acetil (Pérez et al., 2023). Após a reação para acoplamento do grupamento furano no HA, é possível observar a presença do pico de próton de glucosamina característico do HA nativo na região 1,9 ppm (NIMMO; OWEN; SHOICHET, 2011) e o surgimento de dois picos nas regiões de 6,38, 6,5 ppm e um na região 7,5 ppm, os picos referem-se aos prótons do furano, esses picos mostraram que o grupamento furano foi enxertado com sucesso na molécula de ácido hialurônico. Além disso, é possível comparar os dados obtidos com a literatura onde mostra que os prótons de furano aparecem nessa região (AYEDI *et al.*, 2012, WANG *et al.*, 2018).

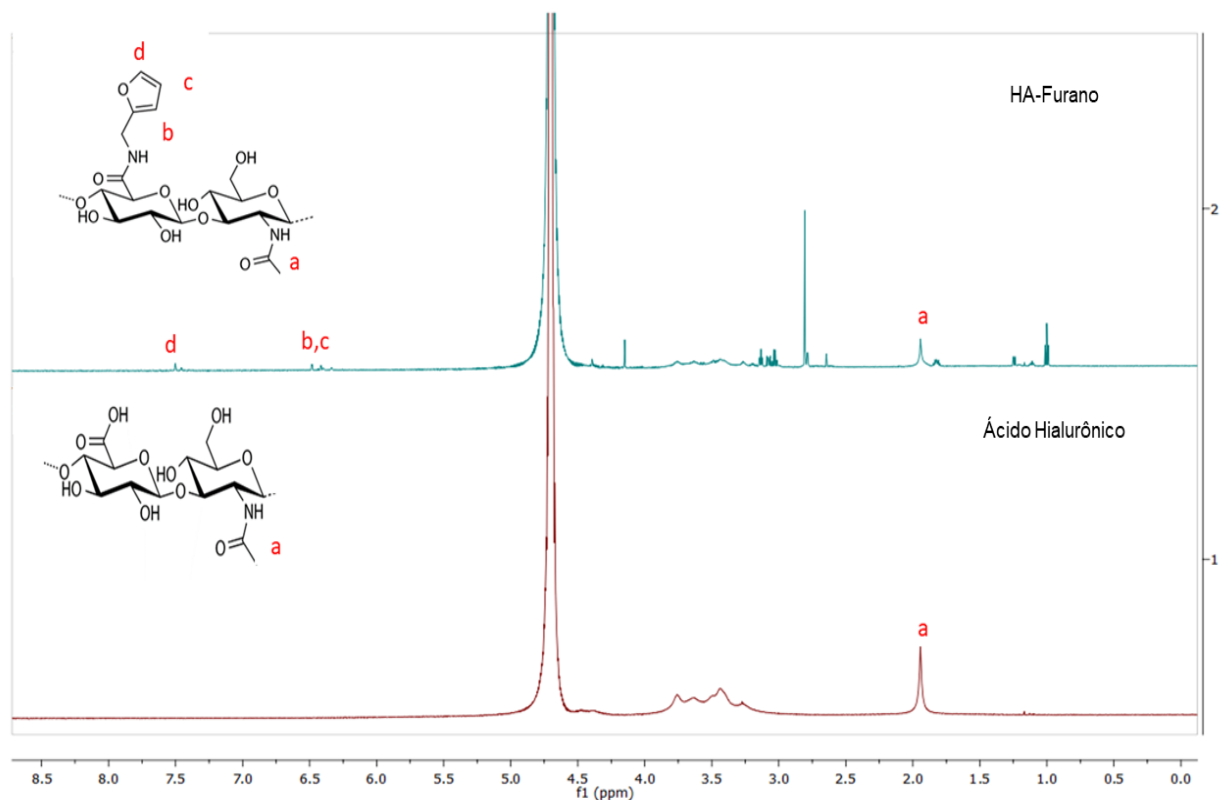


Figura 20. Espectros de ^1H RMN do ácido hialurônico e HA-Furano.

Fonte: elaborada pela própria autora.

A Figura 22, mostra os espectros de ^1H RMN do HA-Furano e HA reticulado com as duas BMs em estudo, ou seja, amostras de HA antes e após a reticulação. O objetivo é avaliar a eficácia da reticulação via Diels-Alder por meio da ligação do furano presente na molécula de HA e a maleimida presente nas duas BMs em estudo. Ao

analisar os espectros de HA-Furano-BM-PEG, verifica-se a presença de picos em 6,38, 6,5 ppm e na região de 7,5 ppm que são picos atribuídos ao furano presente no HA-Furano. No entanto, observou-se também o aparecimento de um pico na região 6,2 ppm indicando a presença da BM-PEG. Na amostra de HA-Furano-BM-Lis é possível observar o desaparecimento dos picos referente ao furano presente na amostra de HA-Furano, indicando assim a ligação via reação Diels-Alder. Ao analisar os espectros de ^1H RMN do HA reticulado com a BM-Lis também é possível notar o surgimento de um pico na região 6,8 ppm, região característica do espectro de BM-Lis. Esses resultados demonstram que houve sucesso na reticulação do HA modificado com furano com a BM-Lis.

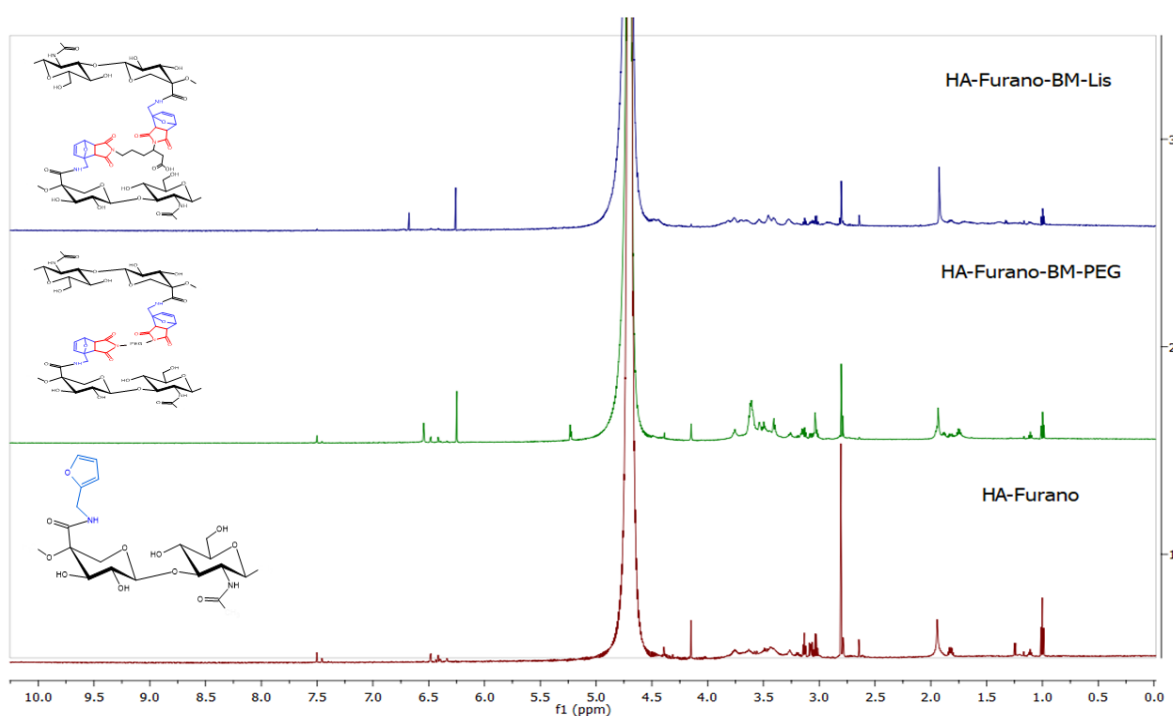


Figura 22. Espectros de ^1H RMN HA-Furano, HA-Furano-BM-PEG e HA-Furano-BM-Lis.

Fonte: elaborada pela própria autora.

Na Figura 23, os espectros de ^1H RMN das amostras de HA reticulado com BM são apresentados antes (23-A, 23-B) e após (23-C e 23-D) o teste de reticulação. A verificação do espectro de ^1H RMN das amostras antes e após o teste de reticulação visa verificar se houve alguma alteração na molécula durante o processo. Como pode ser observado na Figura 23, nas imagens A, B, C e D, não ocorreu modificação na estrutura molecular, uma vez que os picos presentes nos espectros antes do ensaio de reticulação permaneceram inalterados após o teste. Isso confirma o sucesso da

reação de reticulação e indica que não houve alterações significativas durante o teste. No entanto, é observado no espectro das amostras 23-C e 23-D que as amostras estavam mais puras, demonstrando que a água utilizada durante o ensaio não modificou a molécula reticulada, porém removeu o excesso de impureza que estava presente nas amostras. Esta constatação de que não houve modificação da molécula de HA reticulada com as BMs é fundamental, considerando que uma das preocupações deste trabalho é a solubilidade do material em água, devido à sua aplicação em ambiente fisiológico. Contudo, observou-se que o material em estudo (HA-Furano-BM-PEG e HA-Furano-BM-Lis) não são solúveis em água. O que torna o material bastante promissor para uso em meio fisiológico.

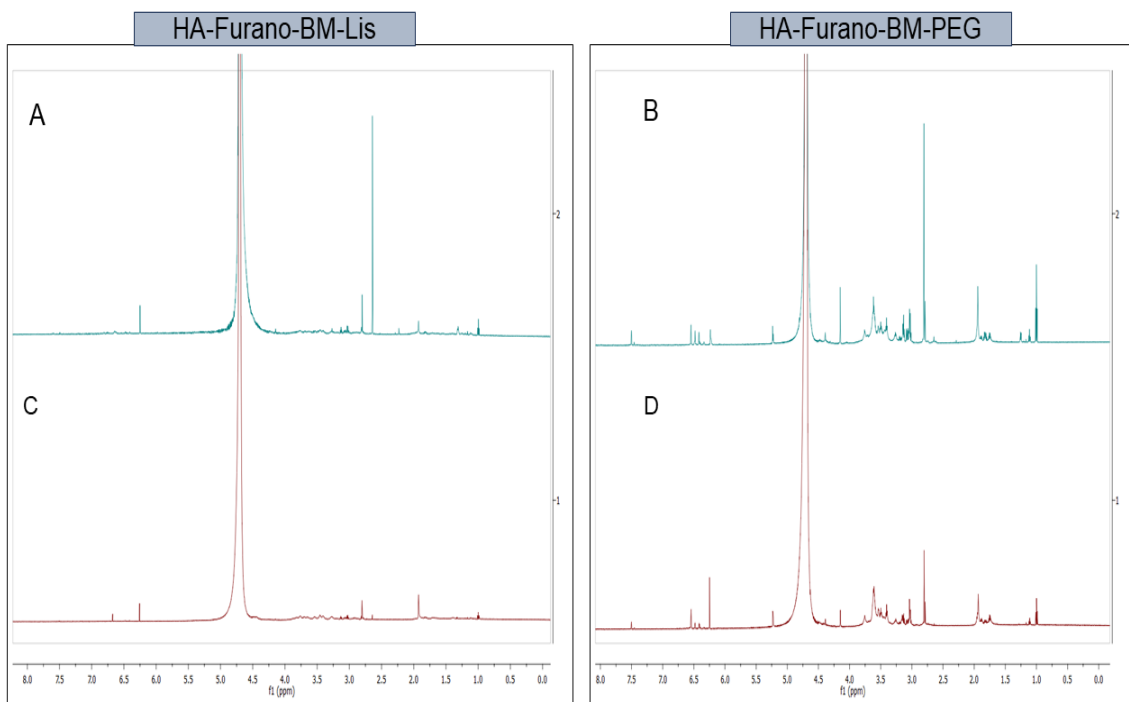


Figura 23. Espectros de ^1H RMN HA-Furano-BM-PEG e HA-Furano-BM-Lis antes e após o “ensaio de reticulação”.

Fonte: elaborada pela própria autora.

4.4. Análise Térmica

Na Figura 24 estão representadas as curvas do segundo aquecimento obtidas por (DSC). Nas curvas de HA e HA-Furano é possível observar que o primeiro pico endotérmico das duas amostras aparece em 150 °C e 160 °C respectivamente. Esse primeiro pico que aparece em ambas as amostras pode estar relacionado a evaporação de água. A intensidade do pico não é tão alterada para o HA-Furano; no

entanto, é deslocado para 160 °C, afetando as ligações de hidrogênio do HA por meio de ligações cruzadas (HOVHANNISYAN *et al.*, 2023). Ambos os termogramas exibiram um pico exotérmico na temperatura de aproximadamente 180 °C rapidamente seguido de um sinal endotérmico largo entre 180 e 190 °C para o HA e HA-Furano, respectivamente, é atribuído à degradação do esqueleto principal do polímero. No entanto, é possível observar que a intensidade do pico do HA-Furano é menor quando comparado com o HA não modificado.

Uma das características da reação Diels-Alder (furano-maleimida) é a possibilidade de reverter essa reação, ou seja, a retro Diels-Alder. A eficiência das reações rDA pôde ser confirmada pelo comportamento térmico dos hidrogéis de ácido hialurônico reticulado. As curvas de DSC presentes na Figura 24, apresentaram um pico endotérmico em torno de 80 °C e 100 °C, associado à ocorrência da reação de rDA, havendo a cisão das ligações entre o furano e a maleimida. Em trabalho realizado por Kramer *et al.*, 2019 foi observado que na faixa de temperatura de 87 °C ocorreu a rDA corroborando com nosso trabalho.

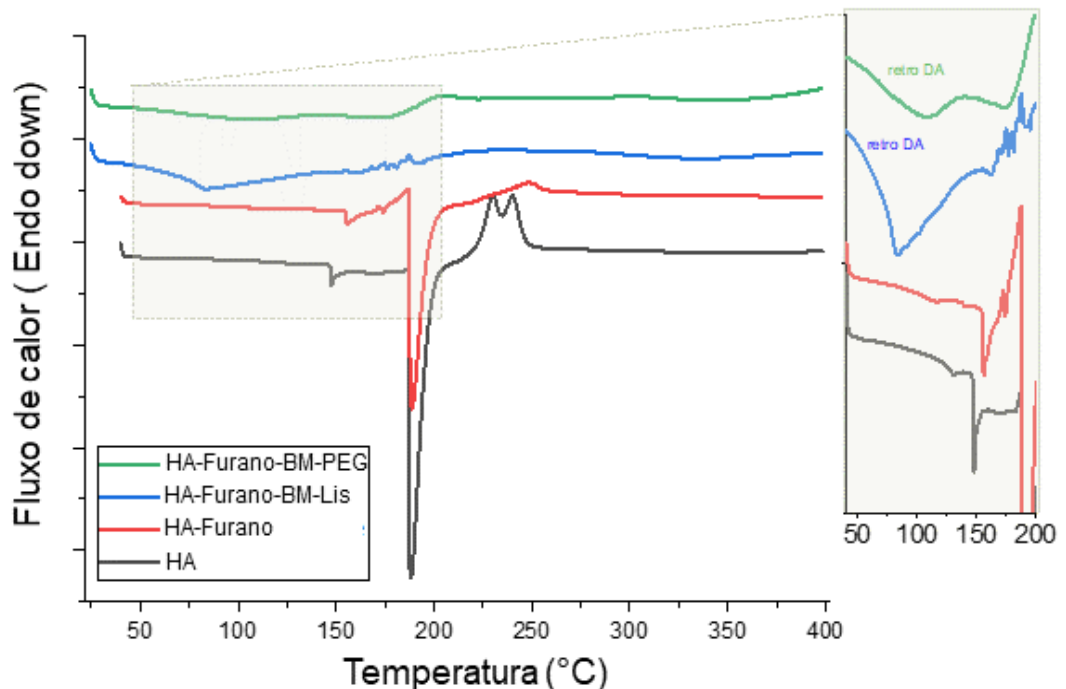


Figura 24. Curvas de aquecimento DSC HA, HA-Furano, HA-Furano-Lis, HA-Furano-BM-PEG

Fonte: elaborada pela própria autora.

A Figura 25 mostra as curvas termogravimétricas (TGA) do HA-Furano-BM-Lis e HA-Furano-BM-PEG. Para o HA-Furano-BM-Lis, houve perda de massa inicial de 7% entre 25 e em 100 °C, que pode ser atribuída inicialmente à evaporação de água até 100 °C. De acordo com a sua natureza, a subsequente perda de massa corresponde à ruptura das interações mais fracas na estrutura polissacarídica do ácido hialurônico até atingir a temperatura de aproximadamente 200°C (WU *et al.*, 2024). A segunda faixa de perda de 200 a 350°C representa a principal perda de massa de 30%, correspondendo à degradação do esqueleto principal do polímero, incluindo anéis sacarídeos e cadeias de macromoléculas, com a temperatura de início de decomposição T_{onset} de 188, 324 e 420 °C, apresentando 30 % de resíduo sólido deixado em 500 °C (AMIRNEJAT; NOSRATI; JAVANSHIR, 2020).

Na literatura, é mencionado que a molécula de HA é classificada como um material sensível ao calor, ou seja, sua temperatura de degradação é relativamente baixa (LOPEZ *et al.*, 2020). Ao compararmos a temperatura de degradação do HA descrita na literatura com os resultados do nosso trabalho, observamos que a BM pode ter influenciado na degradação, já que é conhecida por ser termicamente mais resistente (IREDALE; WARD; HAMERTON, 2017).

O HA-Furano-BM-PEG apresentou uma perda de massa de 5% até 100°C devido à desidratação, tendo uma capacidade semelhante de adsorção de água quando comparado ao HA-Furano-BM-Lis. No entanto, apresentou degradação praticamente em 3 etapas com T_{onset} de 194, 220 e outro em 400 °C com perda de massa de 70% e resíduo de aproximadamente 25% a 500°C. A degradação do HA reticulado com a BM-PEG, pode ter ocorrido de forma mais rápida devido ter um grau de reticulação menor quando comparado com a o HA reticulado com a BM-Lis.

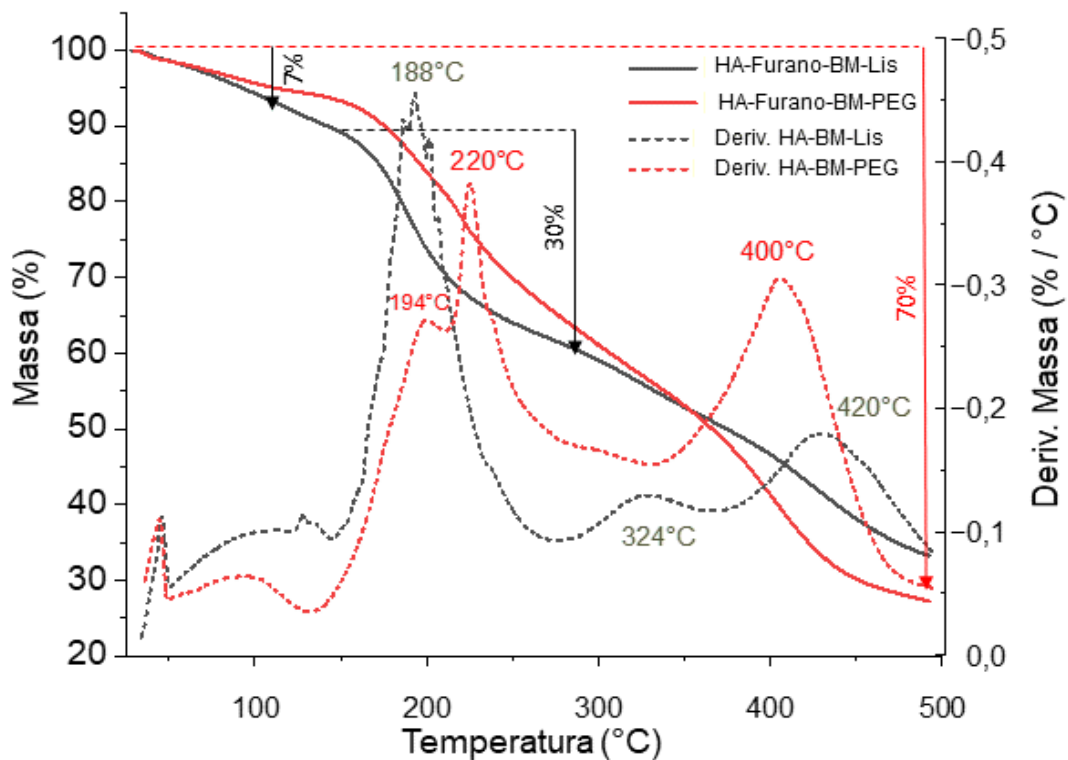


Figura 25. Curvas termogravimétrica HA-Furano-BM-Lis e HA-Furano-BM-PEG.
 Fonte: elaborada pela própria autora.

4.5. Análise Visual de Viscosidade e Formação do Hidrogel

A Figura 26, mostra as mudanças visuais observadas no HA natural, HA-Furano, HA-Furano-BM-PEG e HA-Furano-BM-Lis. Na Figura 26-A, é possível notar uma diminuição significativa da viscosidade no HA após a modificação com a furfurilamina, possivelmente associada à diminuição do número de grupos de hidroxila devido a substituição por grupos furânicos. A literatura destaca a importância de compreender a influência dos grupos hidroxila (OH) nas propriedades dos materiais. A quantidade desses grupos pode influenciar na viscosidade, já que cada grupo OH é potencialmente capaz de formar até três ligações de hidrogênio (JADŹYN; ŚWIERGIE, 2019).

Por outro lado, nas imagens da Figura 26-B e C é perceptível o aumento da viscosidade do HA-Furano após ser reticulado com a BM-PEG e BM-Lis, o aumento da viscosidade ocorreu bem rápido em aproximadamente 1 minuto após o contato com as bismaleimidas, indicando que houve a reticulação por meio da ligação do

furano presente no HA-Furano e da maleimida presente na BM. Na Figura 26-C é possível observar um aumento da viscosidade ainda mais expressivo em comparação com a 26-B onde foi reticulado com a BM-PEG. Este resultado evidencia a maior eficácia da BM-Lis como agente reticulante. Em trabalho anterior publicado por nosso grupo onde foi utilizado o amido modificado com grupamento furânico (álcool furfurílico) reticulado com a BM-PEG também foi observado aumento considerável da viscosidade corroborando com nosso estudo (ANTUNES *et al.*, 2022).

O comportamento de gelificação rápido e controlável não é apenas benéfico para o encapsulamento e sobrevivência celular, mas também benéfico para a operação do hidrogel HA reticulado na prática clínica. Para confirmação do aumento da viscosidade foram realizadas análises reológicas das amostras, antes e após a reticulação via reação Diels Alder.

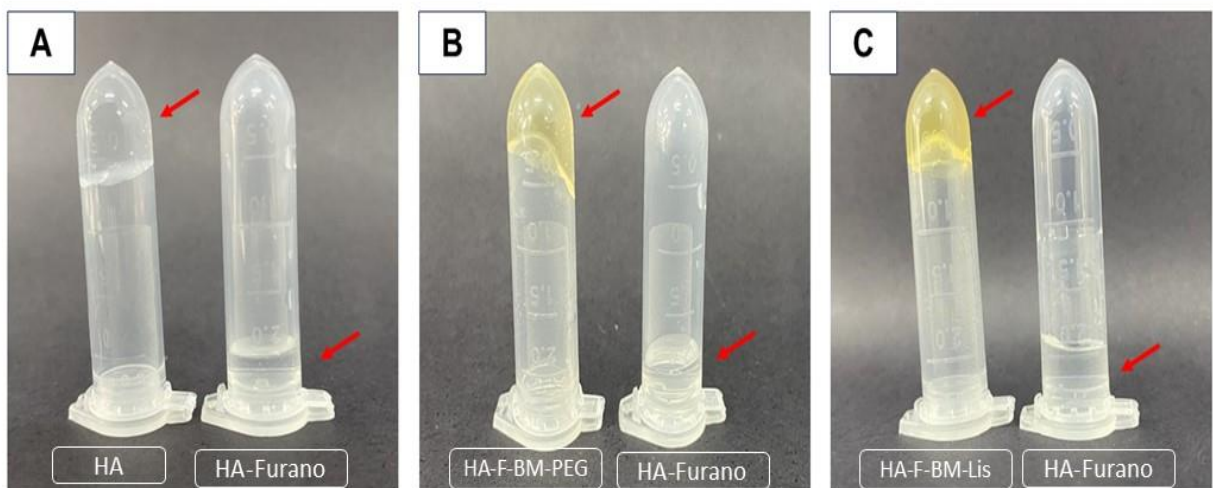


Figura 26. Mudanças visuais observadas no HA natural, HA-Furano e HA-Furano-BM-PEG e HA-Furano-BM-Lis.

Fonte: elaborada pela própria autora.

4.6. Análises Reológicas

O acompanhamento das mudanças nas propriedades reológicas, ou seja, a determinação das propriedades reológicas antes, durante e após a reticulação completa dos materiais, é fundamental para estudar e validar as condições de aplicação dos hidrogéis injetáveis propostos. A análise reológica ajuda a avaliar o comportamento do fluxo dos hidrogéis sob condições de injeção. Ela avalia parâmetros como viscosidade e comportamento de afinamento, garantindo que o

hidrogel possa ser facilmente injetado por meio de agulhas médicas sem entupir ou causar resistência excessiva. Compreender essas características do hidrogel HA antes e após a reticulação é de extrema importância para esse estudo, uma vez que se pretende colocar células nesse biomaterial. Sabe-se que os hidrogéis podem sofrer forças de cisalhamento durante a injeção e compreender como esse material se comporta é fundamental, pois o cisalhamento pode causar danos às células (GALLO *et al.*, 2019). Outras propriedades reológicas dos hidrogéis, como elasticidade e módulo (G' e G''), são essenciais para manter sua integridade estrutural durante e após a injeção. Isto garante que o hidrogel mantenha a sua forma e funcionalidade no local de administração.

Na Figura 27-A, nota-se que o HA é a amostra com maior viscosidade, após ser modificado com a furfurilamina (HA-Furano) se torna a amostra com menor viscosidade, o que é altamente relevante para este estudo. Espera-se um aumento na viscosidade após a aplicação (injeção) do hidrogel, pois, para o transporte celular, é fundamental que o material seja mais fluido, reduzindo assim o cisalhamento e, conseqüentemente, minimizando a morte celular. A amostra de HA-Furano-BM-Lis apresentou maior viscosidade, quando comparado com HA-Furano-BM-PEG e menor viscosidade quando comparado com o HA. O aumento da viscosidade das amostras de HA reticulado com ambas as BM se deve à rede polimérica que se formou após a reticulação entre o furano presente no ácido hialurônico modificado com furfurilamina e a maleimida presente na BM. Também observou-se que em diferentes níveis de tensão de cisalhamento ocorre um forte comportamento de afinamento por cisalhamento com queda da viscosidade em todas as amostras em estudo, demonstrando um comportamento pseudoplástico, o que faz com que fiquem no estado sólido em repouso, mas sob tensão de cisalhamento eles possuem propriedade líquida e podem fluir (CHEGINI *et al.*, 2020). Esse comportamento reológico se deve ao desembaraço e alinhamento dessas microestruturas e à quebra das estruturas tridimensionais na direção do fluxo. A rigidez da rede depende de seus emaranhados mecânicos, do número de pontos de contato ou interações entre cadeias poliméricas, de suas forças de coesão e de forças eletrostáticas entre as cadeias. A Figura 27-B mostra a relação entre a tensão de cisalhamento e da taxa de cisalhamento, mostrando que com o aumento gradual da taxa de cisalhamento, a tensão de cisalhamento aumenta continuamente. Essa característica é observada em todas as amostras analisadas.

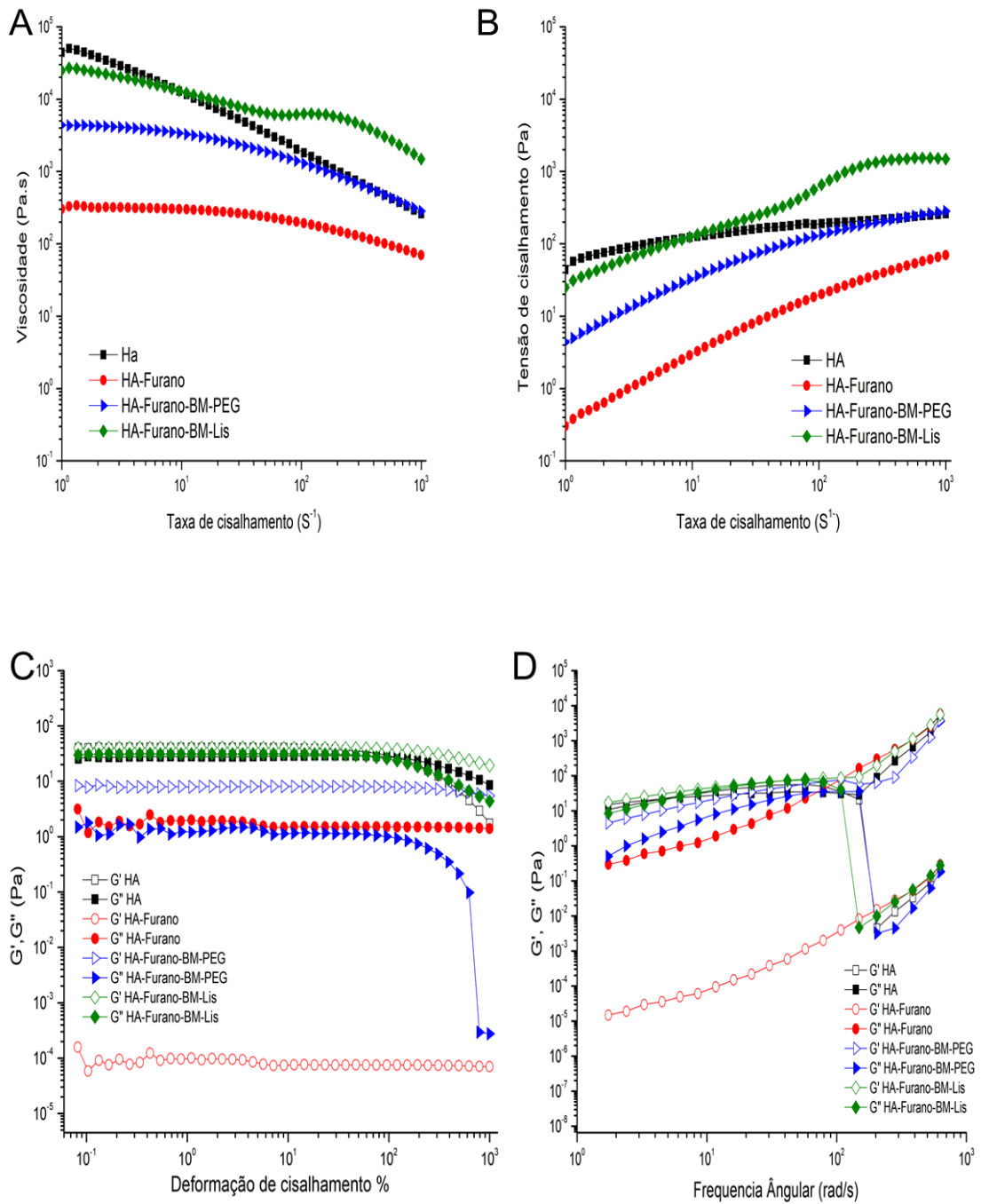


Figura 27. Caracterizações reológicas dos hidrogéis antes e após a reticulação com BM-PEG e BM-Lis. Viscosidade em função da taxa de cisalhamento (A), curva de fluxo de tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento (B), módulo de armazenamento e módulo de perda em função da deformação de cisalhamento (C), módulo de armazenamento e módulo de perda em função da frequência angular (D). **Fonte:** elaborado pela própria autora.

A reação Diels Alder é bem descrita na literatura, em trabalho publicado em 2011 por Nimmo e colaboradores foi demonstrado que a reação de clique de Diels-Alder é

um método de reticulação adequado e muito eficiente para formação de hidrogel de HA. Nesse trabalho, eles avaliaram as propriedades reológicas do HA reticulado com BM. Também foi observado que todas as amostras apresentaram uma diminuição da viscosidade conforme o aumento da taxa de cisalhamento, provavelmente esse comportamento ocorreu devido a ruptura da rede estrutural dos polímeros (NIMMO; OWEN; SHOICHET, 2011).

As características viscoelásticas dos hidrogéis como: o comportamento de deformação (Figura 27-C) e medições de varredura de frequência (Figura 27-D) foram determinadas por testes oscilatórios. Dois parâmetros são importantíssimos para avaliar a viscoelasticidade de um fluido. São eles o módulo viscoso (G'') e o módulo elástico (G') (COSTA; NACCACHE; VARGES, 2017). A varredura de deformação é importante pois determina o limite da região linear viscoelástica (região LVE), a região LVE indica a faixa na qual o teste pode ser realizado sem destruir a estrutura da amostra. É a região representada do lado esquerdo do gráfico, ou seja, a faixa com os valores de deformação mais baixos. Na região LVE, esta função mostra um valor constante, denominado valor platô. O módulo de elasticidade ou de armazenamento (G') é uma medida da energia armazenada em um material no qual a deformação por cisalhamento foi imposta, já o módulo viscoso ou de perda (G'') é uma medida da energia dissipada em um material, no qual foi imposta deformação. Acredita-se que os hidrogéis que têm G' relativamente maior tenham efeitos duradouros (FUNDARÒ *et al.*, 2022).

Ao analisar a Figura 27-C observa-se que na região LVE o HA apresenta o módulo de armazenamento (G') maior que o módulo de perda (G'') indicando que a amostra nessa região apresenta estrutura tipo gel ou sólida, no entanto podemos observar que no final da varredura o G'' foi maior que G' indicando que nessa região a amostra exibe uma estrutura fluida. Em contrapartida a amostra de HA-Furano, apresenta um comportamento líquido onde observa-se no gráfico um G'' maior que G' . Também se observa uma distância bem significativa entre o módulo de perda em comparação ao o módulo de armazenamento do HA-Furano, o que não foi observado nas demais amostras. Isso pode ter ocorrido devido a substituição das hidroxilas presente na molécula de HA que foram substituídas por grupamentos furânicos.

Como foi observado, a quantidade de OH pode influenciar fortemente, nas propriedades dos líquidos (JADŻYN; ŚWIERGIE, 2019), isso também pode explicar a proximidade dos módulos G' e G'' do HA não modificado, pois a quantidade de hidroxila na molécula é muito maior do que no HA-Furano como foi mostrado na titulação

condutimétrica foi substituição de 40%. Por outro lado, amostras de HA reticulado com bismaleimida, HA-Furano-BM-PEG, HA-Furano-BM-Lis, apresentou o G' maior que G'' demonstrando ter com comportamento elástico predominante, apresentando estrutura tipo gel/sólida podendo ser denominada sólido viscoelástico.

A Figura 27-D contém os resultados das medições de varredura de frequência e avaliados os valores do módulo viscoso e elástico. Ao analisar a amostra de HA observa-se que o HA possui módulo viscoso (G'') maior que módulo elástico (G') indicando predomínio dos efeitos elásticos. Além disso, é possível determinar a região viscoelástica linear, que se encontra dentro da faixa em que os módulos são constantes e paralelos com o tempo. Ao final dessa região, quando ocorre o cruzamento das curvas, o valor de G' ultrapassa o valor de G'' , ou seja, o módulo viscoso torna-se maior que o módulo elástico, indicando o início do escoamento do fluido. Por outro lado, a amostra de HA-Furano apresenta o módulo de viscoso (G'') maior que o módulo elástico durante toda varredura de frequência, também é possível notar que não ocorre o cruzamento das curvas, indicando predomínio viscoso. As amostras de HA reticulado com as BMs apresentaram um comportamento semelhante ao gel com o módulo de armazenamento G' constante e maior que o módulo de perda G'' , indicando que possuem módulo de elasticidade superior ao módulo viscoso (VON *et al.*, 2017).

4.7. Teste de Reticulação

A Figura 28 ilustra as amostras de HA, HA-Furano, HA-Furano-BM-Lis e HA-Furano-BM-PEG, imediatamente após centrifugação, ainda retendo umidade. Ao analisar as imagens 28-C e 28-D, torna-se visível a presença de material reticulado, indicando a formação de uma estrutura de rede, característica de ligações cruzadas dos polímeros, sugestivos de reticulação (FUNDARÒ *et al.*, 2022). No entanto, ao analisar as figuras 28-A e 28-B, torna-se impossível ver a presença de material, indicando que a amostra se dissolveu completamente durante o ensaio e foi totalmente eliminada. As amostras foram então secas em estufa com temperatura controlada a 50°C até alcançarem uma massa estável. Após esta etapa, foi calculada a porcentagem de reticulação. Em primeiro lugar, a amostra de HA e HA-Furano não apresentaram evidência de reticulação, indicando falta de formação de estrutura de rede. Em contraste, o HA-Furano-BM-Lis e HA-Furano-BM-PEG exibiram uma notável taxa de reticulação, calculada em 52% e 38% respectivamente. Isso sugere que a

presença de furano desempenhou um papel crucial na promoção da formação do sistema reticulado por meio de ligações entre o furano presente na molécula de HA e a maleimida presente na BM-Lis e BM-PEG.

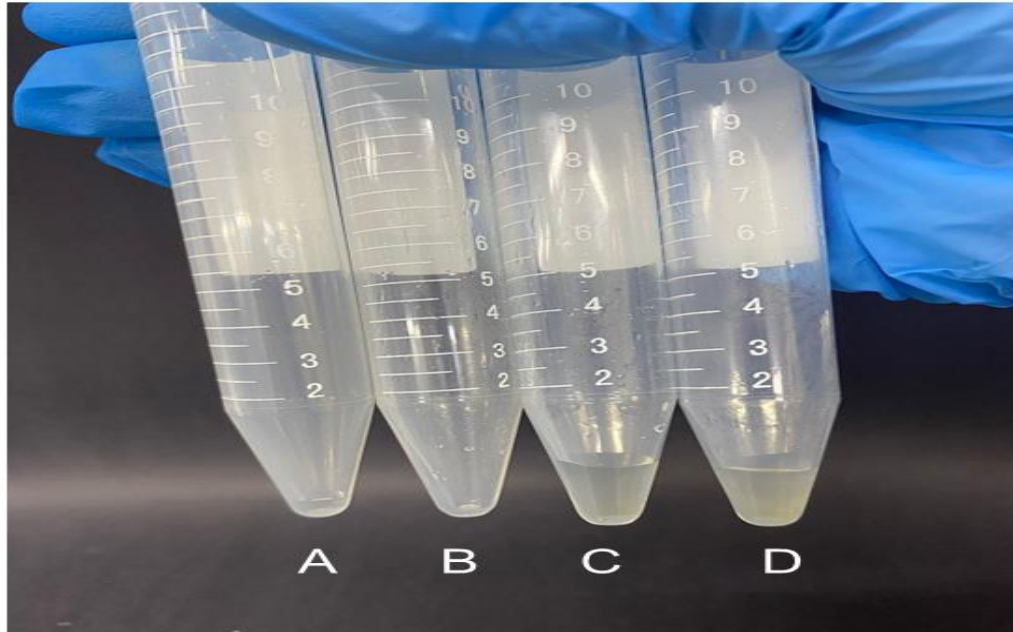


Figura 28. Resultado teste de reticulação, HA (A), HA-Furano (B), HA-Furano-BM-Lis (C) e HA-Furano-BM-PEG (D).

Fonte: Própria autora

4.8. Viabilidade Celular

O teste de citotoxicidade *in vitro* foi conduzido utilizando o método baseado em resazurina. Em resumo, o método é designado para determinar espectrofotometricamente ou fluorometricamente, o número de células em função da atividade metabólica usando o corante resazurina. A resazurina pode ser dissolvida em tampão fisiológico (resultando numa solução de cor azul profundo). A metabolização da resazurina pelas células vivas gera a resorufina que é rosa fluorescente (Figura- 29), sendo que é usada para estimular a viabilidade celular por meio da medição da intensidade de fluorescência. Segundo o padrão, quando houver uma redução de mais de 30% na viabilidade celular é considerada como tendo efeito tóxico para as células (MORDMUANG *et al.*, 2019, DORM *et al.*, 2022).

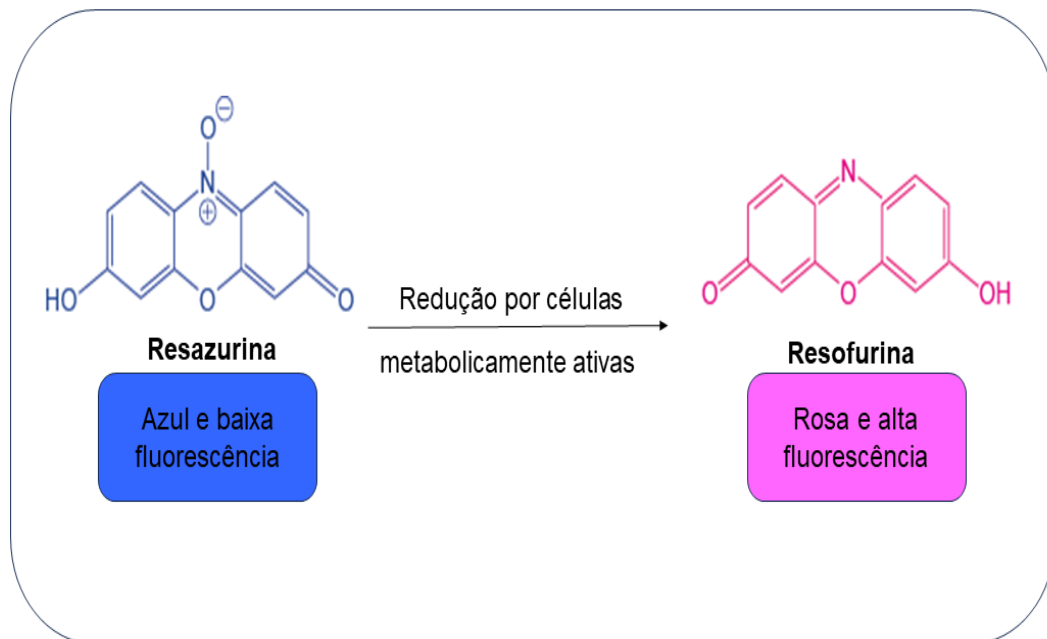
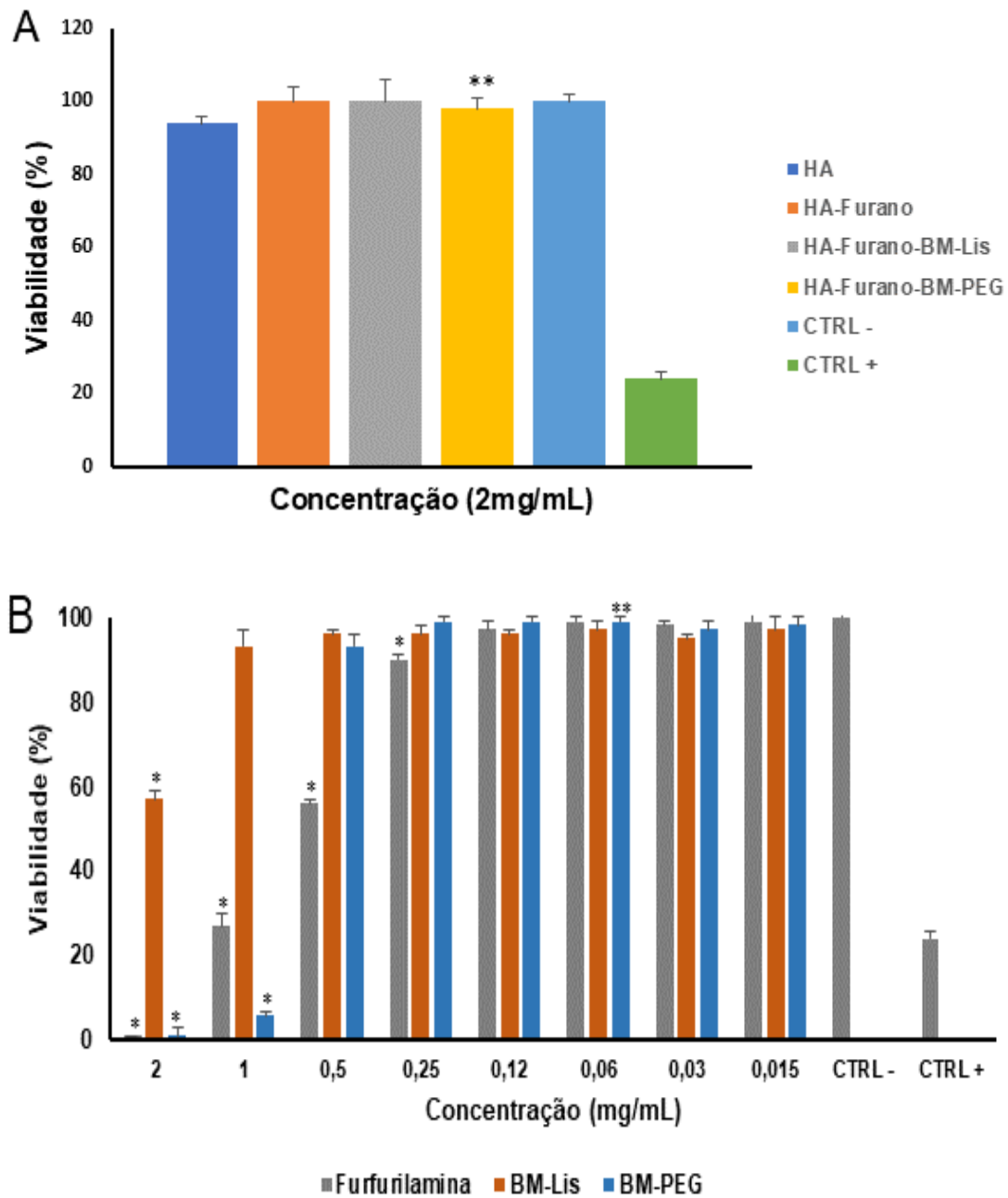


Figura 29. Esquema da conversão intracelular de resazurina azul não fluorescente em resorufina rosa fluorescente.

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

Para o ensaio de viabilidade celular foram testadas as amostras de HA, HA-Furano, HA-Furano-BM-PEG e HA-Furano-BM-Lis e reagentes (BM-PEG, BM-Lis e furfurilamina). O controle negativo mostrou uma porcentagem padrão, ou seja, 100% de negatividade de citotoxicidade. Nos testes observou-se que nas amostras de HA, HA-Furano e HA reticulado com BM-PEG e BM-Lis não foram consideradas tóxicas na concentração testada (Figura 30-A), apresentando uma viabilidade celular superior a 70%. O resultado sugere material com potencial para aplicações na área da saúde, conforme proposto neste trabalho. Já em relação aos reagentes utilizados nas reações químicas de modificação (BM-PEG, BM-Lis e furfurilamina), as células foram viáveis a partir da concentração de 0,25mg/mL para furfurilamina, já a BM-PEG se mostrou viável a partir da concentração 0,5mg/mL e pôr fim a BM-Lis foi viável a partir de 1mg/mL (Fig. 30-B), sendo citotóxico (menor que 70% de viabilidade) em concentrações mais elevadas. Com base nos resultados encontrados, sugere-se que os 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 na concentração testada.



* diferença significativa ($p < 0,01$) comparando ao controle negativo.

** diferença significativa ($p < 0,05$) comparando ao controle negativo.

Figura 30. Resultados da análise de viabilidade celular, HA, HA-Furano, HA-Furano-BM-PEG, HA-Furano-BM-Lis (a) e Furfurilamina, BM-Lis, BM-PEG (b).

Fonte: elaborado pela própria autora.

4.9. Viabilidade Celular Após a Extrusão do Hidrogel

Neste estudo, optou-se por utilizar a concentração de 6 mg/mL para a preparação do hidrogel. Essa escolha foi baseada em observações obtidas previamente no ensaio de reticulação (item 4.5), no qual se verificou que tanto o ácido hialurônico (HA) natural quanto o HA reticulado apresentaram viscosidade elevada, fato posteriormente confirmado por meio da análise reológica. A elevada viscosidade observada poderia trazer duas consequências indesejáveis durante a aplicação do material, como o risco de obstrução da agulha durante a injeção e maior dificuldade de escoamento do hidrogel através da seringa, exigindo maior pressão para a aplicação. Considerando que o primeiro ponto potencial de dano celular pode ocorrer no próprio processo de injeção, devido às forças de cisalhamento às quais as células são submetidas ao passar da seringa para a agulha (AGUADO *et al.*, 2012).

A Figura 31, mostra os resultados de viabilidade celular após a extrusão do hidrogel pela agulha, observa-se que o número inicial de células viáveis presente nas amostras de controle era de 1×10^5 células. Após a passagem do material pela agulha, observou-se que a amostra composta apenas por HA que apresentou a maior viscosidade, exibiu a menor quantidade de células viáveis, com $2,5 \times 10^4$ células vivas. Em contraste, as amostras de HA-Furano apresentaram a maior viabilidade celular, com $6,1 \times 10^4$ células vivas. Esse resultado pode estar diretamente relacionado à baixa viscosidade dessa amostra, que provavelmente reduziu a intensidade das forças de cisalhamento durante a injeção, minimizando o dano celular. Apesar do melhor desempenho em termos de viabilidade, é importante considerar que o HA-Furano não é reticulado, ou seja, trata-se de uma molécula linear. Em ambiente fisiológico, essa característica resultaria em uma meia-vida reduzida, uma vez que a presença de enzimas como as hialuronidases aceleraria sua degradação em comparação aos materiais reticulados. Por esse motivo, torna-se necessária a reticulação do HA para aumentar sua resistência à degradação enzimática (FUNDARÒ *et al.*, 2022). As amostras de HA reticuladas com BM-Lis e BM-PEG apresentaram diferentes níveis de viabilidade celular. A formulação HA-BM-Lis apresentou uma viabilidade de $3,8 \times 10^4$ células vivas, enquanto a amostra HA-BM-PEG apresentou uma viabilidade em de $2,8 \times 10^4$ células vivas.

Procedimentos de injeção celular tipicamente resultam em déficit de células vivas, com viabilidades tão baixas quanto 1% a 32% após o transplante (AGUADO *et*

al., 2012). Grande parte da pesquisa recente sobre carreadores celulares de hidrogel tem se concentrado no papel desses materiais após a administração ao tecido ou órgão alvo. Por exemplo, os hidrogéis podem atuar como arcabouços para a adesão celular local (CHOI *et al.*, 2020).

O hidrogel injetável ideal tem que ser fluido o suficiente para passar pelas agulhas da seringa, mas ainda atingir alta rigidez dentro do corpo. A gelificação térmica com foco na mudança de temperatura durante a injeção é útil, e polímeros termossensíveis como poli(N-isopropilacrilamida) e Pluronic® têm sido usados para esse propósito (CHEON *et al.*, 2024).

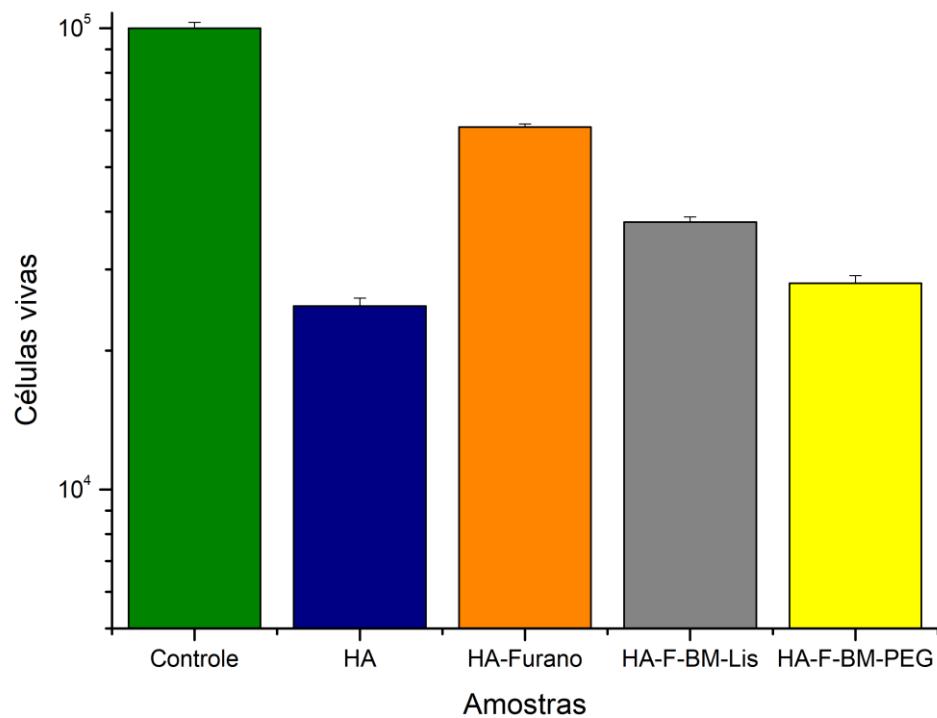


Figura 31. Viabilidade celular após a extrusão do hidrogel pela agulha.
Fonte: elaborado pela própria autora.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que a modificação química do ácido hialurônico com furfurilamina foi bem-sucedida, confirmada por meio de caracterização por RMN e FTIR, que revelaram a presença do grupo furânico na amostra modificada. A titulação condutimétrica quantificou a presença de furano no ácido hialurônico modificado de

aproximadamente 40% de substituição. Além disso, a síntese do aduto furano anidrido maleico e da bismaleimida a partir da modificação química da lisina foi confirmada após a caracterização desses materiais. Por meio da análise térmica foi possível observar a rDA do HA reticulado.

A etapa de reticulação via reação de Diels-Alder com introdução das bismaleimidias (BM-PEG e BM-Lis) foi realizada com sucesso, evidenciada pela formação do hidrogel, confirmada por análises visuais e reológicas. O teste de citotoxicidade demonstrou a viabilidade do material. Portanto, este estudo demonstrou que o ácido hialurônico modificado com furano apresentou mudança de viscosidade e formação de hidrogel em um curto período de tempo por meio da reticulação da ligação do furano presente na molécula de HA e maleimida presente na BM via reação de Diels-Alder.

A avaliação da viabilidade celular após a extrusão do hidrogel por agulha demonstrou que a viscosidade afeta diretamente viabilidade das células. No entanto, os resultados obtidos foram considerados promissores, uma vez que, mesmo após a passagem do hidrogel pela agulha, as células apresentaram elevada taxa de viabilidade.

Por meio dos resultados obtidos até o momento foi demonstrado que o material em estudo é bastante promissor para uso em ambiente fisiológico e para aplicação na forma injetável.

6. PERSPECTIVAS

Com o intuito de aprimorar a viabilidade celular após o processo de extrusão, pretende-se testar diferentes concentrações e avaliar o crescimento das células nos intervalos de 24h e 48h. Além disso, visando explorar o potencial de aplicação do material em tecidos como a cartilagem, propõe-se investigar detalhadamente suas propriedades mecânicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABATANGELO, G. et al. Hyaluronic acid: redefining its role. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1743, 2020.
- ABDEL-RAHMAN, R. M.; ABDEL-MOHSEN, A. M. Marine biomaterials: hyaluronan. **Marine Drugs**, v. 21, n. 8, p. 426, 2023.
- AGUADO, B. A. et al. Improving viability of stem cells during syringe needle flow through the design of hydrogel cell carriers. **Tissue Engineering Part A**, v. 18, n. 7-8, p. 806-815, 2012.
- AGUERO, L. et al. Functional role of crosslinking in alginate scaffold for drug delivery and tissue engineering: A review. **European Polymer Journal**, v. 160, p. 110807, 2021.
- AKRAM, M. et al. Amino acids: A review article. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 17, p. 3997-4000, 2011.
- ALIU, E.; KANUNGO, S.; ARNOLD, G. L. Amino acid disorders. **Annals of translational medicine**, v. 6, n. 24, p. 471, 2018.
- ANASTASSIADIS, S. L-Lysine fermentation. **Recent patents on Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 11-24, 2007.
- AMIRNEJAT, S.; NOSRATI, A.; JAVANSHIR, S. Superparamagnetic Fe₃O₄@Alginate supported L-arginine as a powerful hybrid inorganic–organic nanocatalyst for the one-pot synthesis of pyrazole derivatives. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 34, n. 10, p. e5888, 2020.
- ANTUNES, B. F. et al. Crosslinking starch with Diels–Alder reaction: water-soluble materials and water-mediated processes. **Polymer International**, v. 71, n. 11, p. 1340-1346, 2022.
- ANTUNES, J. C. et al. Novel poly (L-lactic acid) /hyaluronic acid macroporous hybrid scaffolds: Characterization and assessment of cytotoxicity. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 94, n. 3, p. 856-869, 2010.
- ARAÚJO, E. S. et al. Oxygen-generating microparticles in chondrocytes-laden hydrogels by facile and versatile click chemistry strategy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 205, p. 111850, 2021.
- ARITA, A.; TOBITA, M. Current status of platelet-rich plasma therapy under the act on the safety of regenerative medicine in Japan. **Regenerative Therapy**, v. 23, p. 37-43, 2023.

ARMIENTO, A. R. et al. Biomaterials for Articular Cartilage Tissue Engineering: Learning from Biology. **Acta Biomaterialia**, v. 65, p. 1-20, 2017.

ANSARI, E. S.; GHIASI, R.; FORGHANIHA, A. Thermodynamic and kinetic studies of the retro-Diels-Alder reaction of 1, 4-cyclohexadiene, 4H-pyran 4H-thiopyran, 1, 4-dioxine, and 1, 4-dithiine: a theoretical investigation. **Structural Chemistry**, v. 30, p. 877-885, 2019.

AYEDI, M. A. et al. Simple, novel synthesis of furfurylamine from furfural by one-pot reductive amination in water using zinc metal. **Journal de la Société Chimique de Tunisie**, v. 14, p. 109-116, 2012.

BAS, Y.; SANYAL, R.; SANYAL, A. Hyaluronic-acid based redox-responsive hydrogels using the Diels-Alder reaction for on-demand release of biomacromolecules. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 60, n. 4, p. 246-254, 2023.

BATTIGELLI, A.; ALMEIDA, B.; SHUKLA, A. Recent advances in bioorthogonal click chemistry for biomedical applications. **Bioconjugate Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 263-271, 2022.

BAUER, D. et al. Click chemistry: a transformative technology in nuclear medicine. **Nature protocols**, v. 18, n. 6, p. 1659-1668, 2023.

BERNE, D. et al. Thia-Michael Reaction: The Route to Promising Covalent Adaptable Networks. **Polymers**, v. 14, n. 20, p. 4457, 2022.

BORZACCHIELLO, A. et al. Hyaluronic acid based hydrogels for regenerative medicine applications. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

BOUTEFNOUCHET, T. et al. Hylan GF-20 Viscosupplementation in the Treatment of Symptomatic Osteoarthritis of the Knee: Clinical Effect Survivorship at 5 Years. **Knee Surgery & Related Research**, v. 29, n. 2, p. 129–136, 2017.

CADAMURO, F.; RUSSO, L.; NICOTRA, Francesco. Biomedical hydrogels fabricated using diels–alder crosslinking. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2021, n. 3, p. 374-382, 2021.

CAILLOL, S. Special issue “natural polymers and biopolymers II”. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 112, 2020.

CARNEIRO, J. et al. Development and characterization of hyaluronic acid-lysine nanoparticles with potential as innovative dermal filling. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 645-651, 2016.

CHEGINI, S. P. et al. Shear sensitive injectable hydrogels of cross-linked tragacanthic acid for ocular drug delivery: Rheological and biological evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 2789-2804, 2020.

CHEN, H.; QIN, J.; HU, Y. Efficient degradation of high-molecular-weight hyaluronic acid by a combination of ultrasound, hydrogen peroxide, and copper ion. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 617, 2019.

CHEON, S. Y. et al. Injectable and Self-Curing Single-Component Hydrogel for Stem Cell Encapsulation and In Vivo Bone Regeneration. **Advanced Science**, v. 11, n. 16, p. 2304861, 2024.

CHERNYSHEV, V. M.; KRAVCHENKO, O. A.; ANANIKOV, V. P. Conversion of plant biomass to furan derivatives and sustainable access to the new generation of polymers, functional materials and fuels. **Russian Chemical Reviews**, v. 86, n. 5, p. 357, 2017.

CHOI, H. et al. Visible-Light-Induced Cysteine-Specific Bioconjugation: Biocompatible Thiol–Ene Click Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 59, n. 50, p. 22514-22522, 2020.

CHOI, U. Y. et al. An Injectable Hyaluronan–Methylcellulose (HAMC) Hydrogel combined with Wharton’s jelly-derived mesenchymal Stromal cells (WJ-MSCs) promotes degenerative disc repair. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 19, p. 7391, 2020.

COFFMAN, J. E. et al. Optimization of surface display of DENV2 E protein on a nanoparticle to induce virus specific neutralizing antibody responses. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, n. 5, p. 1544-1552, 2018.

COLLINS, M. N.; BIRKINSHAW, C. Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 104, n. 5, p. 3183-3191, 2007.

CONROZIER, T.; CHEVALIER, X. Long-term experience with hylan GF-20 in the treatment of knee osteoarthritis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, n. 10, p. 1797–1804, 2008.

CORTES, H. et al. Hyaluronic acid in wound dressings. **Cellular and Molecular Biology**, v. 66, n. 4, p. 191-198, 2020.

COSTA, C. M.; NACCACHE, M. F.; VARGES, P. Caracterização reológica de fluidos complexos. **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, p. 3-28, 2017.

CUSTERS, R. J. H. et al. Articular cartilage degeneration following the treatment of focal cartilage defects with ceramic metal implants and compared with microfracture. **The Journal of Bone and Joint Surgery-American**, v. 91, n. 4, p. 900-910, 2009.

DEPTUŁA, M. et al. Application of 3D-printed hydrogels in wound healing and regenerative medicine. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 167, p. 115416, 2023.

DING, Y. H. et al. The crosslink between the hyaluronic acid and drugs treated by reactive oxygen species produced in plasma based on the molecular dynamics simulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, p. 124944, 2023.

DORM, B. C. et al. Synthesis and biological properties of alanine-grafted hydroxyapatite nanoparticles. **Life**, v. 13, n. 1, p. 116, 2022.

D’SOUZA, A. A.; SHEGOKAR, R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. **Expert opinion on drug delivery**, v. 13, n. 9, p. 1257-1275, 2016.

ELDEEB, M. A.; AKIH-KUMGEH, B. Recent trends in the production, combustion and modeling of furan-based fuels. **Energies**, v. 11, n. 3, p. 512, 2018.

ESCHENBRENNER-LUX, V.; KUMAR, K.; WALDMANN, H. The Asymmetric Hetero-Diels–Alder Reaction in the Syntheses of Biologically Relevant Compounds. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 42, p. 11146-11157, 2014.

European Biomass Industry Association. <https://www.eubia.org/cms/wiki-biomass/biomass-characteristics-2/> . Acesso em 21/08/2025.

FALLACARA, A. et al. Hyaluronic acid in the third millennium. **Polymers**, v. 10, n. 7, p. 701, 2018.

FUNDARÒ, S. P. et al. The rheology and physicochemical characteristics of hyaluronic acid fillers: Their clinical implications. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 18, p. 10518, 2022.

GALLO, N. et al. Hyaluronic acid for advanced therapies: Promises and challenges. *European Polymer Journal*, v. 117, p. 134-147, 2019.

GANDINI, A. The furan/maleimide Diels–Alder reaction: A versatile click–unclick tool in macromolecular synthesis. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 1, p. 1-29, 2013.

GANDINI, A.; BELGACEM, M. N. Furan derivatives and furan chemistry at the service of macromolecular materials. In: **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. Elsevier, p. 115-152, 2008.

GANDINI, A. et al. Materials from renewable resources based on furan monomers and furan chemistry: work in progress. *Journal of Materials Chemistry*, v. 19, n. 45, p. 8656-8664, 2009.

GANDINI, A.; LACERDA, T. M. Furan polymers: state of the art and perspectives. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 307, n. 6, p. 2100902, 2022.

GEVREK, T. N.; SANYAL, A. Furan-containing polymeric Materials: Harnessing the Diels-Alder chemistry for biomedical applications. **European Polymer Journal**, v. 153, p. 110514, 2021.

GRAÇA, M. F. P. et al. Hyaluronic acid—Based wound dressings: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 241, p. 116364, 2020.

GREGORITZA, M.; BRANDL, F. P. The Diels–Alder reaction: a powerful tool for the design of drug delivery systems and biomaterials. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals**, v. 97, p. 438-453, 2015.

HE, X. et al. Recent advances in photo-crosslinkable methacrylated silk (Sil-MA) - based scaffolds for regenerative medicine: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 128031, 2023.

HEARN, B. R. et al. Attenuation of the reaction of Michael acceptors with biologically important nucleophiles. **Bioconjugate Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 794-800, 2021.

HONG, S. et al. Biomaterials for reliable wearable health monitoring: Applications in skin and eye integration. **Biomaterials**, v. 314, p. 122862, 2025.

HOVHANNISYAN, A. et al. The Preparation of Silver and Gold Nanoparticles in Hyaluronic Acid and the Influence of Low-Pressure Plasma Treatment on Their Physicochemical and Microbiological Properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 24, p. 17285, 2023.

HU, W. et al. Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. **Biomaterials science**, v. 7, n. 3, p. 843-855, 2019.

IREDALE, R. J.; WARD, C.; HAMERTON, I. Modern advances in bismaleimide resin technology: A 21st century perspective on the chemistry of addition polyimides. **Progress in Polymer Science**, v. 69, p. 1-21, 2017.

IZQUIERDO, E.; DELGADO, A. Click chemistry in sphingolipid research. **Chemistry and physics of lipids**, v. 215, p. 71-83, 2018.

JADŻYN, J.; ŚWIERGIEL, J. Molecular understanding of the viscosity variety within self-assembled hydroxyl liquids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 293, p. 111472, 2019.

KHAN, S. A. et al. Fourier transform infrared spectroscopy: fundamentals and application in functional groups and nanomaterials characterization. **Handbook of materials characterization**, p. 317-344, 2018.

KAUSHIK, K. et al. Natural polymers and their applications. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 37, n. 2, p. 30-36, 2016.

KASHPAROVA, V. P. et al. Furan monomers and polymers from renewable plant biomass. **Russian Chemical Reviews**, v. 90, n. 6, p. 750, 2021.

KHABAROV, V. N.; BOYKOV, P. Y.; SELYANIN, M. A. **Hyaluronic acid: Production, properties, application in biology and medicine**. John Wiley & Sons, 2015.

KIM, Y. S.; GUILAK, F. Engineering hyaluronic acid for the development of new treatment strategies for osteoarthritis. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 15, p. 8662, 2022.

KIRMANI, M. H. et al. Learning from nature: molecular rearrangement in the bismaleimide system leading to dramatic increase in impact strength. **ACS Applied Polymer Materials**, v. 2, n. 2, p. 758-767, 2020.

KOEHLER, K. C.; ANSETH, K. S.; BOWMAN, C. N. Diels–Alder mediated controlled release from a poly (ethylene glycol) based hydrogel. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 2, p. 538-547, 2013.

KOLIOS, G.; MOODLEY, Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, v. 85, n. 1, p. 3-10, 2012.

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.

KRUEGER, S. et al. Establishment of a new device for electrical stimulation of non-degenerative cartilage cells in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 394-410, 2021.

KULKARNI VISHAKHA, S.; BUTTE KISHOR, D.; RATHOD SUDHA, S. Natural polymers—A comprehensive review. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 1597-1613, 2012.

LEGRÉ-BOYER, V. Viscosupplementation: Techniques, indications, results. **Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research**. v. 101, n. 1, p. 101–108, 2015.

LIANG, L. et al. Preparation and characterization of bismaleimide-resin-based composite materials. **Materials**, v. 17, n. 8, p. 1727, 2024.

LIMA-COSTA, M. F. et al. Cohort profile: the Brazilian longitudinal study of ageing (ELSI-Brazil). **International Journal of Epidemiology**, v. 52, n. 1, p. e57-e65, 2023.

LINS, C. et al. otimização da Reação de Diels-Alder Utilizada no Método uop-326 para Quantificação de Dienos Conjugados em Gasolinas de FCC. **II Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo & Gás. Rio de Janeiro**. 2003.

LINS, A. C. A. et al. Effect of hydrocolloids on the physicochemical characteristics of yellow mombin structured fruit. **Food Science and Technology**, v. 34, p. 456-463, 2014.

LIU, S. et al. Biomimetic natural biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: new biosynthesis methods, recent advances, and emerging applications. **Military Medical Research**, v. 10, n. 1, p. 16, 2023.

LING, Z. et al. Amino acid metabolism in health and disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 345, 2023.

LOPEZ, K. M. et al. Hyaluronic acid–cellulose composites as patches for minimizing bacterial infections. **ACS omega**, v. 5, n. 8, p. 4125-4132, 2020.

LU, S. et al. Molecular design and application of low dielectric bismaleimide resin. **Polymer Engineering & Science**, v. 64, n. 12, p. 5859-5878, 2024.

LUO, Z. et al. Tailoring hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. **Advanced Functional Materials**, v. 33, n. 49, p. 2306554, 2023.

LUO, Z. et al. Modification and crosslinking strategies for hyaluronic acid-based hydrogel biomaterials. **Smart Medicine**, v. 2, n. 4, p. e20230029, 2023.

MANJU, S.; SREENIVASAN, K. Conjugation of curcumin onto hyaluronic acid enhances its aqueous solubility and stability. **Journal of colloid and interface science**, v. 359, n. 1, p. 318-325, 2011.

MALDONADO, V. V. et al. Clinical utility of mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine and cellular therapy. **Journal of biological engineering**, v. 17, n. 1, p. 44, 2023.

MARIN, E.; BOSCHETTO, F.; PEZZOTTI, G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. **Journal of biomedical materials research Part A**, v. 108, n. 8, p. 1617-1633, 2020.

MARTÍN, A. R.; PATEL, J. M.; ZLOTNICK, H. M.; CAREY, J. L.; MAUCK, R. L. Emerging therapies for cartilage regeneration in currently excluded 'red knee' populations. **NPJ Regenerative Medicine**, v. 4, n. 12, p. 1-11, 2019.

MIYAGAWA, A.; HASEGAWA, T.; YAMAMURA, H. Synthesis of cyclodextrin dimers via Diels–Alder reaction. **Synthetic Communications**, v. 53, n. 22, p. 1878-1885, 2023.

MORA-BOZA, A. et al. Contribution of bioactive hyaluronic acid and gelatin to regenerative medicine. Methodologies of gels preparation and advanced applications. **European Polymer Journal**, v. 95, p. 11-26, 2017.

MORDMUANG, A. et al. Evaluation of a *Rhodomyrtus tomentosa* ethanolic extract for its therapeutic potential on *Staphylococcus aureus* infections using in vitro and in vivo models of mastitis. **Veterinary research**, v. 50, p. 1-11, 2019.

MOROZOVA, S. M. Recent advances in hydrogels via Diels–Alder crosslinking: Design and applications. **Gels**, v. 9, n. 2, p. 102, 2023.

MUKHERJEE, K. et al. Alginate based semi-IPN and IPN hydrogel for drug delivery and regenerative medicine. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 105402, 2024.

MULJANA, H. et al. Cross-linking of polypropylene via the Diels–Alder reaction. **Polymers**, v. 14, n. 6, p. 1176, 2022.

NAZERI, A.; ARAM, F.; NIAZI, A.. Biosynthesis of hyaluronic acid in *Nicotiana tabacum* plants: an efficient and safe method for large-scale production. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 57-64, 2024.

NICOLAOU, K. C. et al. The Diels–Alder reaction in total synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 10, p. 1668-1698, 2002.

NIMMO, C. M.; OWEN, S. C.; SHOICHET, M. S. Diels–Alder click cross-linked hyaluronic acid hydrogels for tissue engineering. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 3, p. 824-830, 2011.

NWE, Kido; BRECHBIEL, Martin W. Growing applications of “click chemistry” for bioconjugation in contemporary biomedical research. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 24, n. 3, p. 289-302, 2009.

OCANDO, C. et al. Fabrication and properties of alginate-hydroxyapatite biocomposites as efficient biomaterials for bone regeneration. **European Polymer Journal**, v. 151, p. 110444, 2021.

OLAYA, B. et al. Latent class analysis of multimorbidity patterns and associated outcomes in Spanish older adults: a prospective cohort study. **BMC geriatrics**, v. 17, p. 1-10, 2017.

OLATUNJI, O. **Natural polymers**. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2016.

OLUWASANMI, A.; HOSKINS, C. Potential use of the Diels-Alder reaction in biomedical and nanomedicine applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 604, p. 120727, 2021.

PAN, N. C. et al. Improvement production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* in sugarcane molasses. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 182, p. 276-293, 2017.

PARK, H. S. et al. Biological evaluation of micro-patterned hyaluronic acid hydrogel for bone tissue engineering. **Pure and Applied Chemistry**, v. 86, n. 12, p. 1911-1922, 2014.

PÉREZ, L. A. et al. Granular disulfide-crosslinked hyaluronic hydrogels: a systematic study of reaction conditions on thiol substitution and injectability parameters. **Polymers**, v. 15, n. 4, p. 966, 2023.

PETIT-ZEMAN, S. Regenerative medicine. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 201-206, 2001.

POKORSKI, J. K.; SMITH, L. E. "Click" Chemistry for Medicine and Biology. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, p. 2891-2891, 2018.

Population Reference Bureau (PRB). <https://www.prb.org/resources/countries-with-the-oldest-populations-in-the-world/>. Data de acesso: 13/08/2025

POUNTOS, et al. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. **Injury**, v. 38, p. S23-S33, 2007.

RAMZAN, F.; SALIM, A.; KHAN, I. Osteochondral tissue engineering dilemma: scaffolding trends in regenerative medicine. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 19, n. 6, p. 1615-1634, 2023.

RAO, N. V. Hyaluronic acid-based hydrogels for tissue engineering. In: **Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration**. Woodhead Publishing, p. 551-565, 2020.

RAO, V. et al. An efficient reverse Diels-Alder approach for the synthesis of N-alkyl bismaleimides. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 37, p. 5011-5013, 2013.

RATWANI, C. R.; KAMALI, A. R.; ABDELKADER, A. M. Self-healing by Diels-Alder cycloaddition in advanced functional polymers: A review. **Progress in Materials Science**, v. 131, p. 101001, 2023.

RODRÍGUEZ, D. F. et al. Bio-click chemistry: a bridge between biocatalysis and click chemistry. **RSC advances**, v. 12, n. 4, p. 1932-1949, 2022.

SALGADO, A. J. et al. Tissue engineering and regenerative medicine: past, present, and future. **International review of neurobiology**, v. 108, p. 1-33, 2013.

SARAVANAKUMAR, K. et al. Application of hyaluronic acid in tissue engineering, regenerative medicine, and nanomedicine: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 222, p. 2744-2760, 2022.

SEGURA, T. et al. Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. **Biomaterials**, v. 26, n. 4, p. 359-371, 2005.

SEIMS, K. B.; HUNT, N. K.; CHOW, L. W.;. Strategies to Control or Mimic Growth Factor Activity for Bone, Cartilage, and Osteochondral Tissue Engineering. **Bioconjugate Chemistry**. v. 32, n. 5, p. 861-878, 2021.

SELLARDS, R. A.; NHO, S. J.; COLE, B. J. Chondral injuries. **Current Opinion in Rheumatology**. v. 14, n. 2, p. 134–141, 2002.

SHARMA, D.; SAHA, S.; SATAPATHY, B. K. Recent advances in polymer scaffolds for biomedical applications. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 33, n. 3, p. 342-408, 2022.

SHOJARAZAVI, N. et al. Alginate/cartilage extracellular matrix-based injectable interpenetrating polymer network hydrogel for cartilage tissue engineering. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 36, n. 5, p. 803-817, 2021.

SZIJJ, P. A. et al. Tyrosine bioconjugation—an emergent alternative. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 18, n. 44, p. 9018-9028, 2020.

SUNDBERG, L. et al. Increasing inequalities in disability-free life expectancy among older adults in Sweden 2002–2014. **Scandinavian Journal of Public Health**, v. 51, n. 6, p. 835-842, 2023.

SPILLER, K. L.; MAHER, S. A.; LOWMAN, A. M. Hydrogels for the Repair of Articular Cartilage Defects. **Tissue Engineering Part B: Reviews**. v. 17, n. 4, p. 281–299, 2011.

TACHIBANA, Y.; KASUYA, K. I. Bio-based polymers synthesized from furan derivatives. In: **Biopolymers**. Elsevier, 2023. p. 295-345.

TAIARIOL, L. et al. Click and bioorthogonal chemistry: the future of active targeting of nanoparticles for nanomedicines? **Chemical Reviews**, v. 122, n. 1, p. 340-384, 2021.

TAKAYAMA, Y.; KUSAMORI, K.; NISHIKAWA, M. Click chemistry as a tool for cell engineering and drug delivery. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 172, 2019.

TERZIC, A. et al. Regenerative medicine build-out. **Stem cells translational medicine**, v. 4, n. 12, p. 1373-1379, 2015.

THI, T. T. H. et al. Designing biofunctional hydrogels for stem cell biology and regenerative medicine applications. **Journal of industrial and Engineering Chemistry**, 2023.

TINKER, A. The social implications of an ageing population. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 123, n. 7, p. 729-735, 2002.

TONG, X.; MA, Y.; LI, Y. Biomass into chemicals: Conversion of sugars to furan derivatives by catalytic processes. **Applied Catalysis A: General**, v. 385, n. 1-2, p. 1-13, 2010.

TROMBINO, S. et al. Strategies for hyaluronic acid-based hydrogel design in drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 8, p. 407, 2019.

TROVATTI, E. et al. Recycling tires? Reversible crosslinking of poly (butadiene). **Advanced Materials**, v. 27, n. 13, p. 2242-2245, 2015.

TROVATTI, E. et al. Furan-modified natural rubber: A substrate for its reversible crosslinking and for clicking it onto nanocellulose. **International journal of biological macromolecules**, v. 95, p. 762-768, 2017.

TSANAKTSIDOU, E.; KAMMONA, O.; KIPARISSIDES, C. Recent developments in hyaluronic acid-based hydrogels for cartilage tissue engineering applications. **Polymers**, v. 14, n. 4, p. 839, 2022.

TURSI, A. A review on biomass: importance, chemistry, classification, and conversion. **Biofuel Research Journal**, v. 6, n. 2, p. 962-979, 2019.

UDDIN, I. et al. Revisiting the determinants of life expectancy in Asia—Exploring the role of institutional quality, financial development, and environmental degradation. **Environment, Development and Sustainability**, p. 1-21, 2023.

VASVANI, S.; KULKARNI, P.; RAWTANI, D. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. **International journal of biological macromolecules**, v. 151, p. 1012-1029, 2020.

VON L. B. et al. Injectable hydrogels for treatment of osteoarthritis—A rheological study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 477-483, 2017.

WANG, G. et al. A hyaluronic acid based injectable hydrogel formed via photocrosslinking reaction and thermal-induced diels-alder reaction for cartilage tissue engineering. **Polymers**, v. 10, n. 9, p. 949, 2018.

WANG, X. et al. Injectable dextran hydrogels fabricated by metal-free click chemistry for cartilage tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 73, p. 21-30, 2017.

WEI, H. L. et al. Thermosensitive hydrogels synthesized by fast Diels–Alder reaction in water. **Polymer**, v. 50, n. 13, p. 2836-2840, 2009.

WEKWEJT, M. et al. Hyaluronic acid/tannic acid films for wound healing application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 254, p. 128101, 2024.

WU, Q. et al. Recent advances on application of polysaccharides in cosmetics. **Journal of Dermatologic Science and Cosmetic Technology**, p. 100004, 2024.

XIE, Fayang et al. Chemical trigger-enabled bioconjugation reaction. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 19, n. 38, p. 8343-8351, 2021.

XIONG, X. et al. Curing behavior and properties of ultra-high temperature resistant RTM bismaleimide resin. **High Performance Polymers**, v. 35, n. 5, p. 469-479, 2023.

YÁNEZ-VEGA, H.; YÁNEZ-VEGA, K.; BUSTAMANTE-TORRES, M. Synthesis of Hydrogels: Physical and Chemical Cross-Linking. In: **Multifunctional Hydrogels**. CRC Press. p. 70-87. 2024

YANG, J. et al. Constructions and properties of physically cross-linked hydrogels based on natural polymers. **Polymer Reviews**, v. 63, n. 3, p. 574-612, 2023.

YUAN, N. et al. Chitosan, alginate, hyaluronic acid and other novel multifunctional hydrogel dressings for wound healing: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 240, p. 124321, 2023.

ZHAO, R. et al. Click chemistry-aided drug discovery: A retrospective and prospective outlook. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 116037, 2023.

ZHAO, Y. et al. Combined vision and hearing impairment is associated with frailty in older adults: results from the west China health and aging trend study. **Clinical interventions in aging**, p. 675-683, 2022.

ZHU, S. et al. Advanced injectable hydrogels for cartilage tissue engineering. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 954501, 2022.

ZHU, S. et al. Recent advances in patterning natural polymers: from nanofabrication techniques to applications. **Small Methods**, v. 5, n. 3, p. 2001060, 2021.

CAPÍTULO II

Hidrogel de Alginato Modificado com Cisteína: Biomaterial para Aplicação Microbiológica.

RESUMO

A propagação de infecções microbianas representa um cenário desafiador em todo o mundo, com notável demanda por atenção na área da saúde. Tem surgido um aumento de estudos para o desenvolvimento de novos biomateriais com o objetivo de diminuir ou evitar infecções bacterianas, e os polímeros naturais têm sido foco de alguns estudos. O alginato é um polímero natural abundante com potencial para modificações químicas com base na sua estrutura química e, até onde sabemos, não foi modificado para atividade antimicrobiana. Este estudo tem como objetivo preparar um novo biomaterial por meio da modificação química do alginato acoplado à cisteína, visando inferir atividade antimicrobiana ao material resultante, e também, capacidade de geleificação *in situ* pela formação de ligações dissulfeto. Os polímeros foram caracterizados por FTIR, RMN, análise térmica, teste de reticulação, análise reológica, degradação hidrolítica, teste microbiológico (*E. coli* e *S. aureus*) e citotoxicidade. Os resultados não mostraram toxicidade e demonstraram atividade antimicrobiana contra as bactérias estudadas, indicando seu potencial para o desenvolvimento de curativos e outros dispositivos médicos destinados à prevenção de infecções.

Palavras-chave: Alginato; cisteína; atividade antimicrobiana; *E. coli*, *S.aureus*.

ABSTRACT

The spread of microbial infections represents a challenging scenario worldwide, with a notable demand for attention in the health area. There has been an increase in studies into the development of new biomaterials with the aim of reducing or preventing bacterial infections, and natural polymers have been the focus of some studies. Alginate is an abundant natural polymer with the potential for chemical modifications based on its chemical structure and, as far as we know, it has not been modified for antimicrobial activity. This study aims to prepare a new biomaterial through the chemical modification of alginate coupled with cysteine, with the aim of inferring antimicrobial activity to the resulting material, as well as in situ gelling capacity through the formation of disulfide bonds. The polymers were characterised by FTIR, NMR, thermal analysis, cross-linking test, rheological analysis, hydrolytic degradation, microbiological test (*E. coli* and *S. aureus*) and cytotoxicity. The results showed no toxicity and demonstrated antimicrobial activity against the bacteria studied, indicating their potential for the development of dressings and other medical devices aimed at preventing infections.

Keywords: Alginate, cysteine, antimicrobial activity, *E. coli*, *S. aureus*.

1. INTRODUÇÃO

A resistência aos antibióticos é hoje uma das ameaças mais graves à saúde pública global, o combate à resistência bacteriana, tem se tornando um desafio cada vez mais complexo de enfrentar, pois os antibióticos continuam a ser o principal recurso de controle bacteriano. Os dados mostram que para cada antibiótico desenvolvido existe um microrganismo que se torna resistente a ele (MATICA *et al.*, 2019).

Os agentes antimicrobianos têm sido usados desde pelo menos 2.000 anos atrás, quando os antigos egípcios e gregos usavam diferentes extratos de plantas e mofo para tratar infecções. No entanto um grande marco para a ciência ocorreu em 1928, com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, até os dias atuais, os antibióticos têm estado entre os medicamentos mais comumente usados para o tratamento de infecções por bactérias (LETEK, 2023).

Os antibióticos foram introduzidos pela primeira vez na década de 1940, levando à crença de que as doenças bacterianas seriam erradicadas. No entanto, os microrganismos, incluindo o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*) começaram a desenvolver resistência aos antibióticos a partir do aumento do uso e abuso de antibióticos e uso incorreto desses medicamentos (PLUMET *et al.*, 2022). Com poucos novos antibióticos chegando ao mercado, há uma necessidade de novos materiais antimicrobianos. Nesse contexto, a otimização de moléculas já existentes ou a criação de combinações de diferentes compostos emerge como uma abordagem promissora no combate aos patógenos (MATICA *et al.*, 2019).

Biomateriais antibacterianos são desenvolvidos como substitutos dos antibióticos em alguns casos. Entre eles, os hidrogéis antibacterianos estão atraindo cada vez mais atenção devido ao fácil processo de preparação e à diversidade de estruturas, alterando seus reticulantes químicos via ligações covalentes ou interações físicas não covalentes, o que pode dotá-los de diversas funções específicas, como alta tenacidade e extensibilidade, injetabilidade, autocura, adesividade tecidual e hemostasia rápida, carregamento fácil e liberação controlada do medicamento, biocompatibilidade e antioxidante superiores, bem como boa condutividade (TAO *et al.*, 2019; CAO *et al.*, 2021). Os polímeros antimicrobianos apresentam grande potencial para o tratamento de bactérias resistentes a medicamentos; no entanto, projetar polímeros antimicrobianos que possam matar seletivamente bactérias

causar toxicidade relativamente baixa a tecidos/células normais continua sendo um desafio importante (GENG *et al.*, 2023).

A pesquisa e o desenvolvimento de novos biomateriais com propriedades antimicrobianas têm aumentado a fim de diminuir a propagação da contaminação (GANESAN, 2017). Os polímeros naturais têm ganhado evidência neste campo (CALDEIRA *et al.*, 2013). Polímeros de base biológica sintetizados a partir de recursos renováveis (CAILLOL, 2020) são materiais promissores para substituir os materiais poliméricos de origem fóssil. Além disso, muitos dos polímeros de base biológica existentes podem ser biodegradáveis, em particular os polissacarídeos e as proteínas (MUÑOZ-BONILLA *et al.*, 2019).

O alginato é um polímero natural abundante, foi descrito pela primeira vez pelo químico britânico ECC Stanford em 1881 (SAJI *et al.*, 2022) é um polissacarídeo encontrado naturalmente na parede celular de algas e na cápsula bacteriana de espécies como *Azotobacter sp* e *Pseudomonas sp*. Nas algas marrons, esse polímero confere resistência e flexibilidade às paredes celulares, funcionando como uma proteção contra danos causados pela força das ondas marinhas. Já em bactérias, o alginato forma a cápsula protetora, favorece a formação de biofilmes e contribui para os processos de adesão e colonização (RAUS; NAWAWI; NASARUDDIN, 2021). A produção em larga escala de alginato começou no final da década de 1920. Devido à sua crescente demanda, o mercado global de alginato atingiu um valor estimado de US\$ 728,4 milhões em 2020, e deverá atingir US\$ 923,8 milhões até 2025 (VASUDEVAN; LEE; LEE, 2021, CHUDASAMA *et al.*, 2021).

O alginato pertence à categoria dos copolímeros lineares e é constituído principalmente por ácidos β -D-manurônicos (M) e ácidos α -L-gulurônicos (G), que estão distribuídos ao longo da estrutura da cadeia polimérica (Fig 32). Pode apresentar sequências monoméricas de resíduos M e G, bem como alternância entre eles, resultando na formação de blocos M e blocos G (homopolímero) e blocos MG (heteropolímero), por meio de ligações glicosídicas (LINS *et al.*, 2014; HUAMANI-PALOMINO *et al.*, 2019). A distribuição percentual dos blocos M e G varia de acordo com a espécie de origem do alginato. Fatores como localização geográfica, habitat e espécies influenciam a distribuição desses grupos, resultando em diferentes propriedades físico-químicas que dependem da relação M/G (ORE *et al.*, 2020).

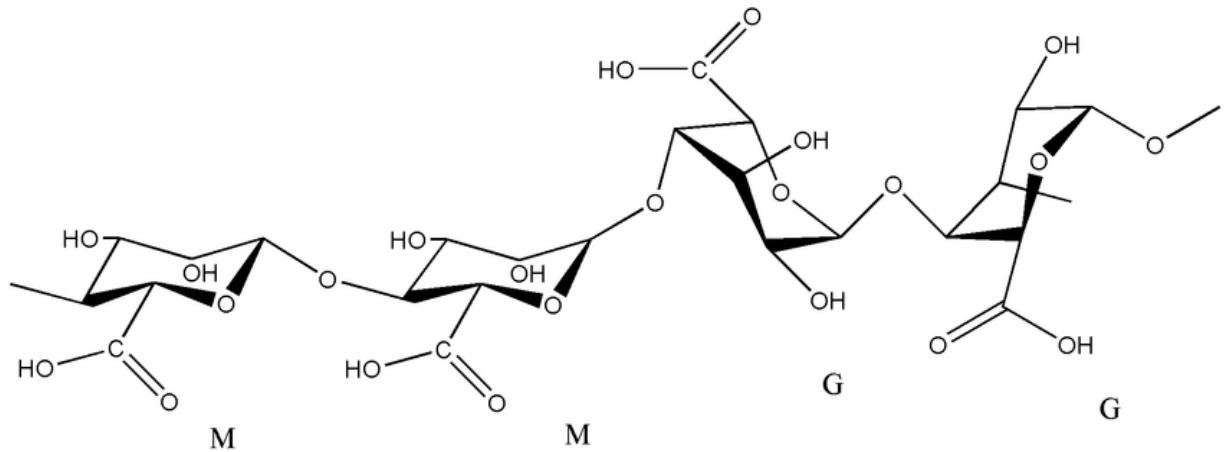


Figura 32. Estrutura do Alginato (Tipos de blocos de Alginato: G = ácido gulurônico, M = ácido manurônico).

Fonte: GOMATHI *et al.*, 2017.

Devido às suas excelentes propriedades como biocompatibilidade, biodegradação, não imunogenicidade, gelificação e capacidade de processamento, os alginatos têm sido amplamente aplicados e explorados em diversos campos, como a engenharia de tecidos (REAKASAME; BOCCACCINI, 2018), distribuição de medicamentos (XIE *et al.*, 2022), cicatrização de feridas, têxteis, cosméticos e alimentos (SANCHEZ-BALLESTER; BATAILLE; SOULAIROL, 2021, TAO *et al.*, 2023). Além das propriedades citadas, o alginato possui unidades de grupos carboxilato e hidroxila em toda sua estrutura, o que possibilita a funcionalização de suas cadeias poliméricas (HUAMANI-PALOMINO *et al.*, 2021, CHUDASAMA *et al.*, 2021, ZHANG; LAN; XIE, 2022).

Estudos recentes têm mostrado resultados promissores no uso de alginato para encapsulamento e liberação sustentada de medicamentos. Em artigo publicado em 2023 por Shi *et al.*, foi investigada a liberação sustentada de hidrogéis de alginato contendo o peptídeo antimicrobiano Chol-37 (F34-R). O hidrogel carregado com peptídeo apresenta uma nova plataforma para aplicações de cicatrização de feridas com a capacidade de compensar a desvantagem da instabilidade e facilidade de manipulação de peptídeos como agentes antibacterianos para aplicação clínica (SHI *et al.*, 2023). Além de encapsular medicamentos, também apresenta propriedades promissoras para incorporação de nanopartículas como a prata para atividade antimicrobiana (MOHAMED; AHMED; ABDEL-GAWAD, 2022).

A estrutura química do alginato é suscetível a reações químicas, o que pode ser útil para aumentar a eficácia para aplicações *in vivo* e *in vitro*, além de inferir

propriedades como atividade antimicrobiana. Outras propriedades como solubilidade, biocompatibilidade, estabilidade e atividade do componente biológico são mantidas ou melhoradas como resultado da natureza do material quimicamente modificado (LI *et al.*, 2010).

A modificação química do alginato com grupos tiol é de grande interesse devido às propriedades únicas dos hidrogéis tiolados. Esses hidrogéis possuem propriedades como mucoadesividade, capacidade de absorção de água, estabilidade e biocompatibilidade. Além disso, os tióis podem reticular cadeias poliméricas. Polímeros modificados com tiol têm a capacidade de formar géis *in situ* por meio de ligações dissulfeto. Estas características dos hidrogéis tiolados os tornam promissores para aplicações biomédicas (PÉREZ *et al.*, 2023).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

O alginato de sódio, cloreto de cálcio (CaCl_2), foram adquiridos da Dinâmica Química Contemporânea LTDA (Brasil), a L-Cisteína foi fornecida pela Ajinomoto (98% em peso, Brasil), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) foram adquiridos da Chem-Impex Int'L Inc (Wood Dale, Illinois, EUA), o ácido clorídrico (HCl) e o hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil), o ágar nutriente foi adquirido da Kasvi, *E. coli* ATCC 43895 e *S. aureus* ATCC 14458 foram adquiridos da American Type Culture Collection, ATCC, NÓs, resazurina sódica, óxido de deutério (D_2O) membranas de diálise foram adquiridas da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

2.2. Métodos

2.2.1. Síntese do bioconjugado alginato-cisteína

A síntese do bioconjugado alginato L-cisteína (alginato-Cys) de sódio foi realizada em uma reação de duas etapas, seguindo metodologia descrita na literatura pelo trabalho realizado por Bernkop-Schnurch *et al.*, (2001). O grupo ácido carboxílico do biopolímero foi ativado pela adição de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) na proporção de 2:1,5 (EDC:NHS). Inicialmente,

2,03 g de alginato foram dissolvidos em água destilada (25 mL) e o pH da solução foi ajustado para 6 utilizando NaOH (1 M). O EDC (1,96 g) foi então adicionado à solução sob agitação por 40 minutos a uma temperatura de 40 °C. Em seguida, foram adicionados NHS (1,72 g) e cisteína (2,42 g) e a reação prosseguiu por 3 h. Após a reação, a solução foi dialisada contra água destilada durante 7 dias. Os produtos finais foram liofilizados e armazenados em temperatura entre 2 °C e 8 °C.

A Figura 33 ilustra a bioconjugação alginato-cisteína através da ligação amida entre o grupo amino primário de L-cisteína e o grupo ácido carboxílico do alginato. Primeiramente, mostra o mecanismo de ativação do alginato usando EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida). O EDC reage com os grupos carboxila presentes no alginato, resultando na formação de um intermediário reativo o-acilisourea. Este intermediário é instável e, na presença do NHS (N-hidroxisuccinimida), converte-se em um ativado éster de succinimida, conhecido como éster de succinimida. Este éster é mais estável que o intermediário o-acilisourea e é altamente reativo com grupos amina. O grupo amina da cisteína realiza um ataque nucleofílico ao éster succinimida, culminando na formação de uma ligação amida entre o alginato e a cisteína. Este processo é facilitado pela alta reatividade do éster succinimida gerado na etapa anterior. Durante a formação da ligação amida, NHS é liberado como subproduto (UDOMSOM *et al.*, 2021). Depois que a cisteína é ligada ao alginato, a oxidação dos grupos tiol (-SH) da cisteína levam à formação de pontes dissulfeto (-S-S-) entre duas moléculas de cisteína, gerando a cistina. A oxidação de tióis e a formação de dissulfeto, portanto, representam a química de reticulação covalente (NAEIMIPOUR *et al.*, 2022). A ligação dissulfeto (-SS-) (FRANK *et al.*, 2017) resultante da formação de cistina estabiliza a estrutura tridimensional do polímero de alginato modificado.

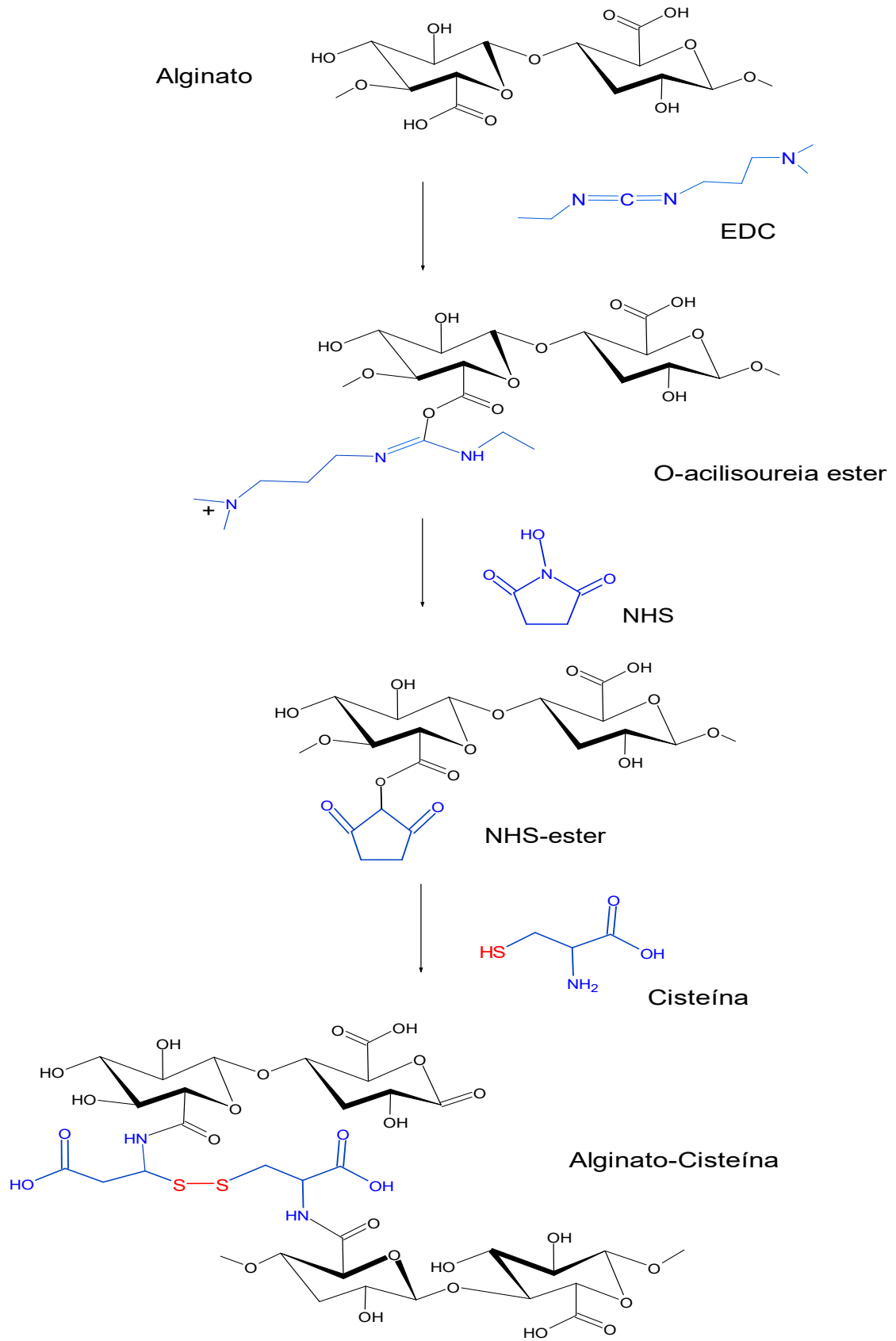


Figura 33. Ilustração esquemática da conjugação alginato-Cys.

Fonte: elaborada pela própria autora.

2.2.2 Síntese do Alginato-Cloreto de Cálcio (alginato-CaCl₂)

A síntese de alginato-CaCl₂ foi adaptada do Rhim, (2004) com base na reticulação física direta. Para preparar uma solução polimérica, 75 mg de alginato foram dissolvidos em 5 mL de água destilada sob agitação contínua até completa solubilização. Em seguida, uma solução aquosa de cloreto de cálcio a 2% foi adicionada gradualmente, gota a gota, até a formação de um hidrogel reticulado. Os íons de cálcio (Ca²⁺) interagem com os grupos carboxilatos na estrutura do alginato, atuando como pontes que ligam as cadeias poliméricas em uma rede tridimensional. Esse processo de ligação dos íons de cálcio às cadeias de alginato resulta na gelificação da solução, formando um gel (MALEKTAJ; DROZDOV; DECLAVILLE CHRISTIANSEN, 2023).

2.3. Caracterização estrutural e físico-química

2.3.1. Caracterização espectroscópica

Para espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), as amostras secas foram analisadas usando um espectrômetro FTIR Perkin-Elmer Spectrum 100 equipado com um dispositivo de diamante de refletância total atenuado revestido com cristal de seleneto de zinco. Os espectros estavam na faixa de 600-4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ após 16 varreduras de espectro. As saídas espectrais foram registradas em transmitância. As medidas de ¹H RMN foram realizadas utilizando um equipamento Bruker 14.1 T, modelo AVANCE III, equipado com uma criosonda TCI de 5 mm e uma cabeça de sonda BBI, respectivamente, e a temperatura foi mantida a 25 °C. As amostras foram dissolvidas em óxido de deutério (D₂O).

2.3.2. Titulação condutométrica convencional

A titulação condutimétrica foi realizada utilizando um condutivímetro (Analyser® 650M). As amostras de alginato e alginato-Cys (0,0045 g/mL) foram homogeneizadas por 5 minutos a 100 rpm e o pH foi ajustado para 2,5 (medidor de pH (Kasvi®) com HCl 0,1 M. Em seguida, a solução polimérica foi mantida sob agitação magnética e titulado com 20 µL de NaOH 0,1 M. A condutividade foi determinada após cada adição de NaOH, em intervalos de 20 segundos, e os resultados foram utilizados para calcular os grupos de ácido carboxílico nas amostras (Eq. 1).

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

Equação 1. Quantificação dos grupamentos carboxílicos

Sendo:

C = concentração do titulante, W = massa da amostra, V1 e V2 = volumes equivalentes em L

2.3.3. Análise térmica

As propriedades térmicas foram investigadas por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) em um equipamento DSC250 da TA Instruments. As amostras de alginato e alginato-Cys foram condicionadas a 40 °C por 24 horas antes dos testes. Amostras secas de 6 mg foram colocadas em uma panela de alumínio hermeticamente selada, e os testes foram executados utilizando como gás de purga o nitrogênio (50 mL/min), uma taxa de aquecimento de 10 °C/min de 20 °C a 300 °C. O comportamento de estabilidade térmica da amostra foi estimado usando análise termogravimétrica (TGA55, TA Instruments) a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min de 25 °C a 600 °C.

2.3.4. Análise Reológica

Os parâmetros reológicos foram determinados em Reômetro Modular Compacto - MCR 92 (Anton Paar® GmbH, Graz, Áustria). Os testes foram realizados a 25 °C, utilizando uma placa geométrica de 50 mm de diâmetro com um espaço de 0,2 mm. Para as análises reológicas foram utilizados 600 µL de cada solução amostra (alginato, alginato-Cys e alginato-CaCl₂) a 15 mg/mL. As amostras foram adicionadas sobre a superfície da placa de leitura, sendo removido o excesso de amostra. Para determinação de viscosidade, foram realizadas medidas na faixa de taxa de cisalhamento de 1 a 1000 s⁻¹. Enquanto os testes de varredura de amplitude foram realizados a uma frequência angular constante de 10 rad. s⁻¹, com a deformação por cisalhamento variando de 0,01 a 100 %.

2.3.5. Teste de Reticulação

As amostras foram secas em estufa a 45 °C até atingirem massa constante. As amostras secas (0,01 g) de alginato, Alginato-Cys e Alginato-Cloreto de Cálcio (alginato-CaCl₂) foram transferidas para um tubo Falcon de 15 mL, foi adicionado 5

mL de água destilada, o tubo foi homogeneizado e em seguida, mantido a 30 °C por 24 horas. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas (4 min, 1700 × g), o polímero foi ressuspense em água e centrifugado novamente (4 min, 1700 × g). Os tubos contendo os polímeros foram levados à estufa a 50 °C até secagem total e massa constante da amostra (massa final). Os resultados representam a média da análise de três amostras. A massa total inicial foi considerada 100 %. O cálculo da porcentagem de reticulação considerou a massa final em relação à massa inicial, conforme equação:

$$\% \text{ reticulação} = (M_f \times 100) / M_i$$

M_i = Massa inicial, M_f = Massa final

2.3.6. Degradação Hidrolítica

Os testes de degradação hidrolítica foram realizados de acordo com ASTM F1635-11. O teste foi realizado durante 8 semanas. O hidrolítico a degradação das amostras foi realizada em tampão fosfato salino (pH 7.4 ± 0.2). O teste foi realizado em triplicata, inicialmente foi adicionado 0.5 mL de água destilada em 0.08g de alginato e de alginato modificado com cisteína, em seguida as amostras foram moldadas em formato de discos e secas em temperatura ambiente. As amostras de alginato natural e alginato-Cys foram acondicionadas em tubos de ensaio com 5 mL de PBS e mantidas em temperatura ambiente. Em diferentes intervalos de tempo (24h, 2^a, 4^a, 6^a, 8^a semanas), o polímero foi ressuspendido e as amostras foram secas em estufa a 60 °C. Adicionalmente, foi monitorada a perda de peso das amostras. O tempo zero foi configurado como antes de iniciar o teste. Os resultados foram obtidos por meio de:

$$\Delta M\% = [(M_0 - M_f) \times 100] / M_0$$

ΔM = perda de peso, M_0 = massa das amostras antes do teste de degradação e M_f = massa das amostras nos diferentes tempos de remoção.

2.4. Caracterização Biológica

2.4.1. Ensaio Microbiológico

A atividade antibacteriana das amostras de alginato, cisteína e alginato-Cys foram testadas pelo método de teste Dynamic Shake Flask (ASTM E2149-10) contra

E. coli e *S. aureus*. As bactérias foram inoculadas em Ágar Nutriente e cultivadas por 18 horas a 37 °C. Os microrganismos foram então suspensos em solução estéril de cloreto de sódio a 0,85 % para atingir uma turbidez equivalente ao padrão McFarland 0,5 ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC. mL⁻¹). Diluições adicionais foram realizadas com solução estéril de cloreto de sódio a 0,85 % para atingir uma concentração bacteriana de 1×10^5 UFC. mL⁻¹. As amostras de alginato, cisteína e alginato-Cys (30 mg) foram autoclavados e esterilizados. Em seguida, 300 µL da suspensão bacteriana (1×10^5 UFC. mL⁻¹) foram adicionados às amostras e incubadas a 37 °C sob agitação contínua por 18 horas. A suspensão bacteriana foi diluída (método de diluição seriada), 100 µL foram espalhados na superfície do Ágar Nutriente e incubados a 37 °C por 24 horas. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi determinado pela contagem das colônias. O controle foi a suspensão bacteriana tratada sem amostras. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis.

2.4.2. Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi investigada utilizando o método padrão de redução de resazurina, utilizando células de fibroblastos de camundongo L929. A cultura celular foi mantida a 37 ± 2 °C em atmosfera de 5 % de CO₂ até atingir 80-90 % de confluência e depois tripsinizada. A suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos a $1200 \times g$ e 0,1 mL (1×10^5 células) foram semeados em uma placa de 96 poços e incubados por 24 horas a 37 ± 2 °C em atmosfera de 5 % de CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi substituído pelo meio de cultura mais as amostras de alginato, cisteína ou alginato-Cys (2 mg/mL). O meio de cultura foi utilizado como controle negativo (para garantir o crescimento celular livre da amostra) e o controle positivo foi utilizado DMSO a 10 % (vol) no meio de cultura. Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS. Solução de resazurina (10 % vol em meio suplementado com DMEM) foi adicionada a cada poço e as microplacas foram incubadas a 37 ± 2 °C durante 4 h e atmosfera de 5 % de CO₂. 100 µL de cada amostra foram transferidos para a microplaca de 96 poços. A fluorescência foi lida em comprimentos de onda de excitação de 560 nm e emissão de 590 nm em um leitor de microplacas (CaryEclipse Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). A viabilidade celular foi relatada como % de viabilidade em comparação com a amostra de controle, utilizando o software Excel para plotagem. Os resultados são relatados como valores médios \pm DP.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização Espectroscópica FTIR e ^1H RMN

Os resultados da espectroscopia FTIR de alginato, cisteína e alginato-Cys são mostrados na Figura 34. O alginato exibe bandas de absorção típicas em 3410 cm^{-1} , correspondendo às vibrações do grupo hidroxila (OH) (PEREIRA *et al.*, 2013), em 1605 e 1410 cm^{-1} atribuído ao C=O e 1023 cm^{-1} correspondente à vibração do anel CO (LIU *et al.*, 2018). O espectro da cisteína apresentou uma banda intensa em 3427 cm^{-1} atribuída ao grupo funcional amina (NH_2), uma banda em 2550 cm^{-1} correspondente à vibração de estiramento de S-H. O Alginato-Cys apresentou as bandas típicas do alginato e da cisteína, como esperado, e as alterações no espectro que indicam o sucesso da reação, na região de 3370 cm^{-1} , um intenso estiramento da hidroxila (TAHA *et al.*, 2005). Particularmente, a nova banda em 1224 cm^{-1} atribuída à ligação C-N indicou a reação do grupo carboxílico do alginato com o grupo amina da cisteína. Curiosamente, a banda S-H típica do alginato não foi exibida na linha alginato-Cys, e uma nova banda em 658 cm^{-1} apareceu, indicando a formação da ligação S-S (vibrações de estiramento δ SS) (ANKIREDDY; KIM, 2015, WEI *et al.*, 2021).

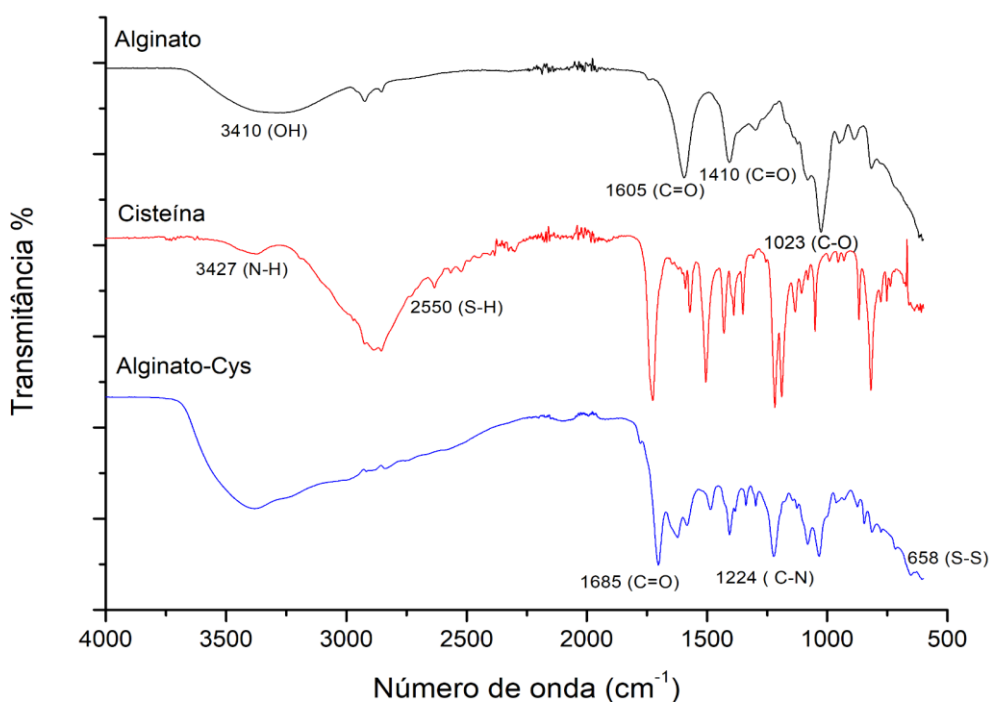


Figura 34. Espectros FTIR de alginato, cisteína e alginato-Cys.

Fonte: elaborada pela própria autora.

Os espectros de ^1H RMN de alginato, cisteína e alginato-Cys são mostrados na Figura 35. Os espectros de alginato não modificado mostram os picos típicos na faixa de 3,5 a 4,0 ppm correspondendo aos hidrogênios do anel. O espectro de cisteína mostra os picos de alta intensidade em 3,1 e 4,2 ppm correspondentes a CH_2 (b) e CH (a) aos prótons metileno e metino (MAO *et al.*, 2019; DORM *et al.*, 2024). No espectro do alginato modificado com cisteína, é possível observar o aparecimento de vários picos, que não estavam presentes no alginato não modificado, na região de 2,8 - 4,5 ppm, indicando que ocorreu funcionalização na reação. O novo pico próximo a 3 ppm pertence aos prótons de metileno, e o novo pico localizado a 4,8 ppm é atribuído a metila. Esse próton do aminoácido está em um ambiente de alta densidade eletrônica, pois é adjacente ao grupo NH e é vizinho do SH, o que faz com que esse próton tenha um deslocamento para baixo campo (MARCANO; SABINO, 2018). Alguns dos sinais observados no alginato-Cys podem ser atribuídos a possíveis resíduos de acoplamento de EDC e compostos NHS, apesar do processo de purificação ao qual o alginato-Cys foi submetido. Isto pode justificar a presença de sinais na região entre 1-1,5 ppm.

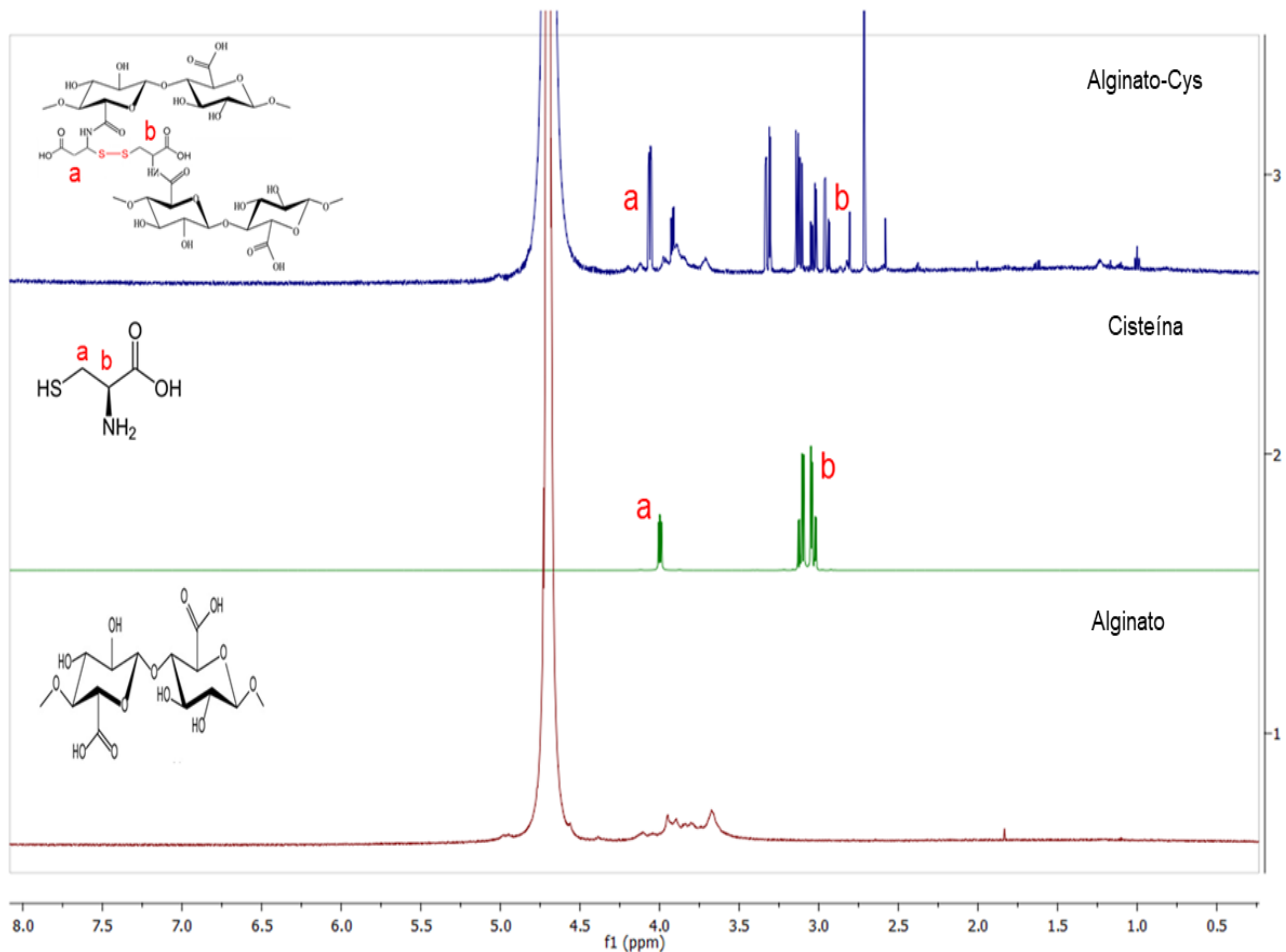


FIGURA 35. Espectros de ^1H -RMN de alginato, cisteína e alginato-cys em D_2O .
Fonte: elaborada pela própria autora.

3.2. Titulação Condutimétrica

A quantidade de grupamentos carboxílicos dos materiais (Alginato e Alginato-Cys) foi determinada por meio de titulação condutimétrica ácido/base (Fig. 36). A partir da análise gráfica é possível visualizar que na amostra de alginato natural, há presença de COOH , uma vez que na molécula de alginato antes da modificação possui em sua estrutura grupamentos carboxílicos (COOH). Já na amostra de alginato modificado com a cisteína, há grupamentos carboxílicos, o que era esperado uma vez que a etapa de modificação do alginato substitui hidroxilas (OH) por grupamentos NH . No entanto, observa-se uma substituição pequena visto que a cisteína também possui grupamentos carboxílicos em sua estrutura. 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 NH. Foi determinado para o alginato natural e alginato modificado respectivamente 8,8 mmols/g e 7,7 mmols/g, sendo possível determinar que o grau de substituição foi aproximadamente de 1,03 mmols/g, correspondendo a uma substituição de 11,70%.

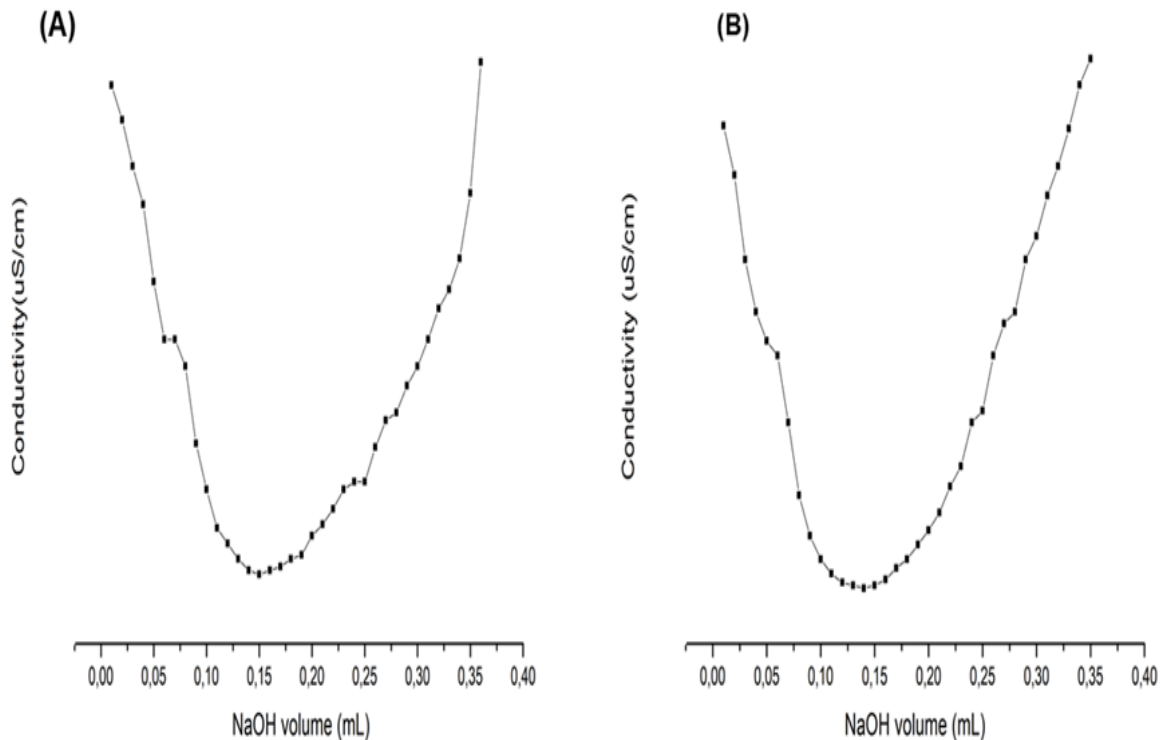


Figura 36. Resultados titulação condutimétrica das amostras de alginato (A) e alginato-Cys (B).

Fonte: elaborada pela própria autora.

3.3. Análises Térmicas

A Figura 37-A mostra as curvas termogravimétricas (TGA) do alginato e do alginato-cisteína. As curvas TG mostram duas fases de decomposição e perda de massa do alginato. Uma perda de massa inicial de 19 % entre 25 e 190 °C, que pode ser atribuída inicialmente à evaporação de água até 100 °C, consistente com a natureza higroscópica, e seguida de perda de massa correspondente à quebra de interações mais fracas na estrutura polissacarídica até 190 °C (ELBAYOMI, 2021). A segunda faixa de perda de 190 a 350 °C representa a principal perda de massa de

36%, correspondendo à degradação do esqueleto principal do polímero, incluindo anéis sacarídeos e cadeias de macromoléculas, com a temperatura de início de decomposição T_{onset} de 232 °C e a temperatura de pico de degradação T_{dmax} de 242 °C e apresentou 37 % do resíduo deixado em 600 °C (AMIRNEJAT; NOSRATI; JAVANSHIR, 2020).

O Alginato-Cys apresentou uma perda de massa de 4 % até 100 °C devido à desidratação, tendo uma menor capacidade de retenção de água quando comparado ao alginato. Apresentou degradação praticamente em uma etapa com T_{onset} de 182 °C, T_{dmax} de 221 °C com perda de massa de 71 % e resíduo sólido de 23 % a 600 °C. Embora a temperatura de degradação seja ligeiramente inferior à do alginato, a introdução de cisteína melhora a estabilidade da cadeia principal do polímero, resultando num único passo de decomposição devido à reticulação.

As curvas de DSC complementam a caracterização térmica e a figura 37-B mostra as curvas de aquecimento e confirma os resultados das temperaturas de transição de degradação da TGA. O primeiro pico endotérmico que aparece no alginato centrado a 153 °C pode estar relacionado com a evaporação da água adsorvida. A intensidade do pico não é tão alterada para o Alginato-Cys; no entanto, é deslocado para 160,5 °C. O pico exotérmico a 234,7 °C para o Alginato está associado à despolimerização, à clivagem térmica dos grupos carboxilatos e à evolução do CO₂ do alginato (SUHAIL *et al.* 2022). Ambos os termogramas exibiram um pico exotérmico a 190 °C rapidamente seguido de um sinal endotérmico largo a aproximadamente 190,6 e 192,8 °C para o Alginato e Alginato-Cys, respectivamente, é atribuído à degradação do esqueleto principal do polímero, o que também pode ser confirmado por meio de TGA.

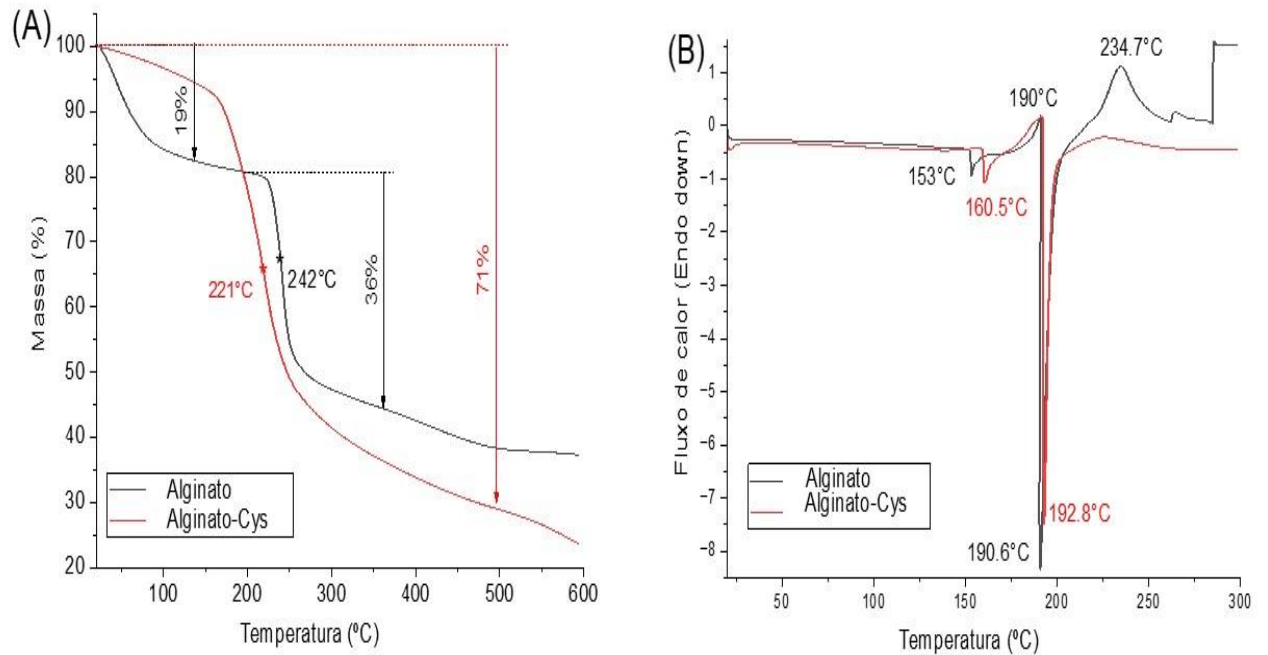


Figura 37. Análise termogravimétrica (A) e curvas de aquecimento DSC (B) para alginato e alginato-Cys.

Fonte: elaborada pela própria autora.

3.4. Análise Reológica

No ensaio reológico, foram analisadas três amostras, como é possível observar na Figura 38. Além da análise do alginato natural e o alginato modificado com cisteína, procedeu-se à análise de uma terceira amostra, que consistia em alginato reticulado com cloreto de cálcio. A inclusão desta amostra no ensaio reológico ocorreu devido ao interesse em compará-la com o alginato modificado com cisteína.

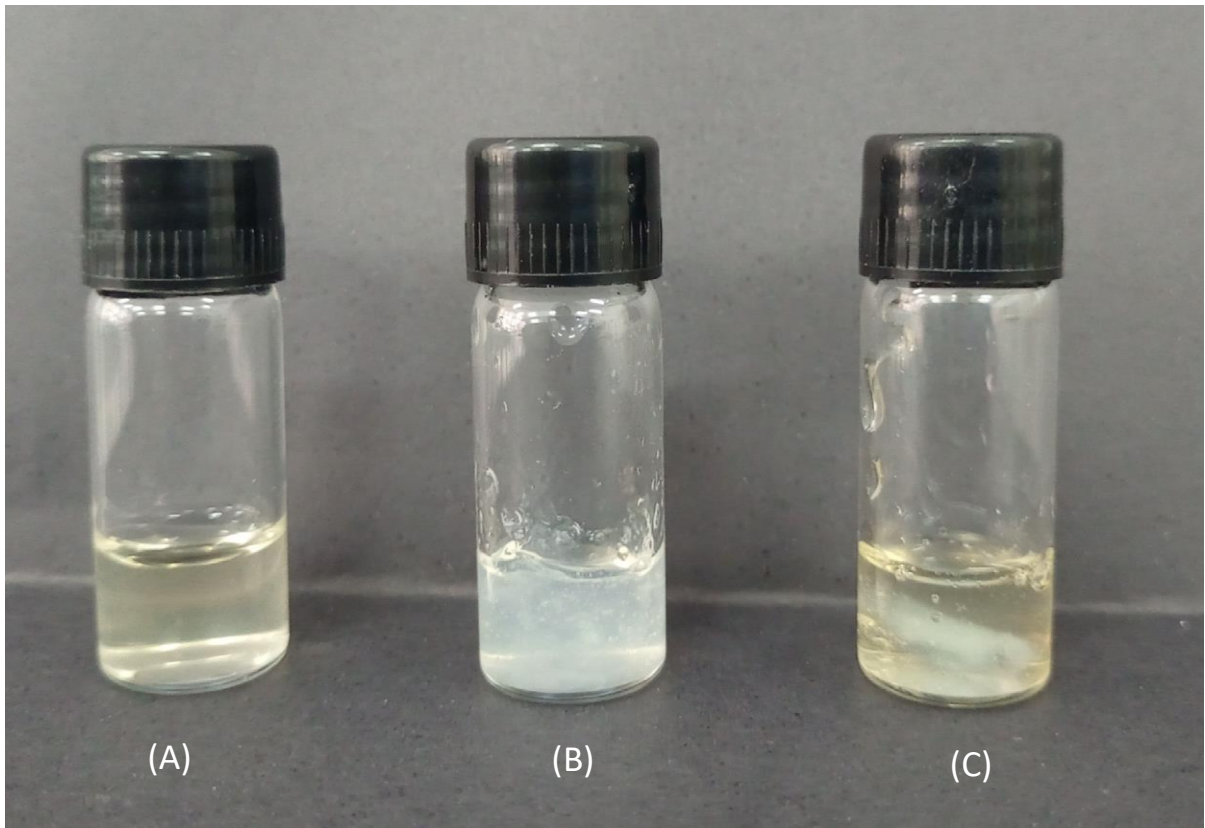


Figura 38. Amostras de alginato (A), alginato-cys (B) e alginato-CaCl₂ (C).
Fonte: elaborada pela própria autora.

A viscosidade está diretamente relacionada às interações moleculares; quanto maiores as interações moleculares, maior a viscosidade do polímero. Na Figura 39, observa-se que o alginato tem uma viscosidade relativamente menor em comparação com as amostras reticuladas. Além disso, o alginato-Cys apresentou maior viscosidade (Fig. 39-B). A viscosidade foi confirmada nos testes reológicos. Além da viscosidade, a amostra reticulada com cisteína também apresentou alteração de cor quando comparada ao alginato não modificado, que originalmente era amarelado e após reticulado com cisteína apresentou coloração esbranquiçada. O alginato-CaCl₂ mantém sua cor amarelada porque as reticulações de Ca²⁺ (ou seja, reticulação não covalente) não alteraram a estrutura química das cadeias de alginato (LIU *et al.*, 2022).

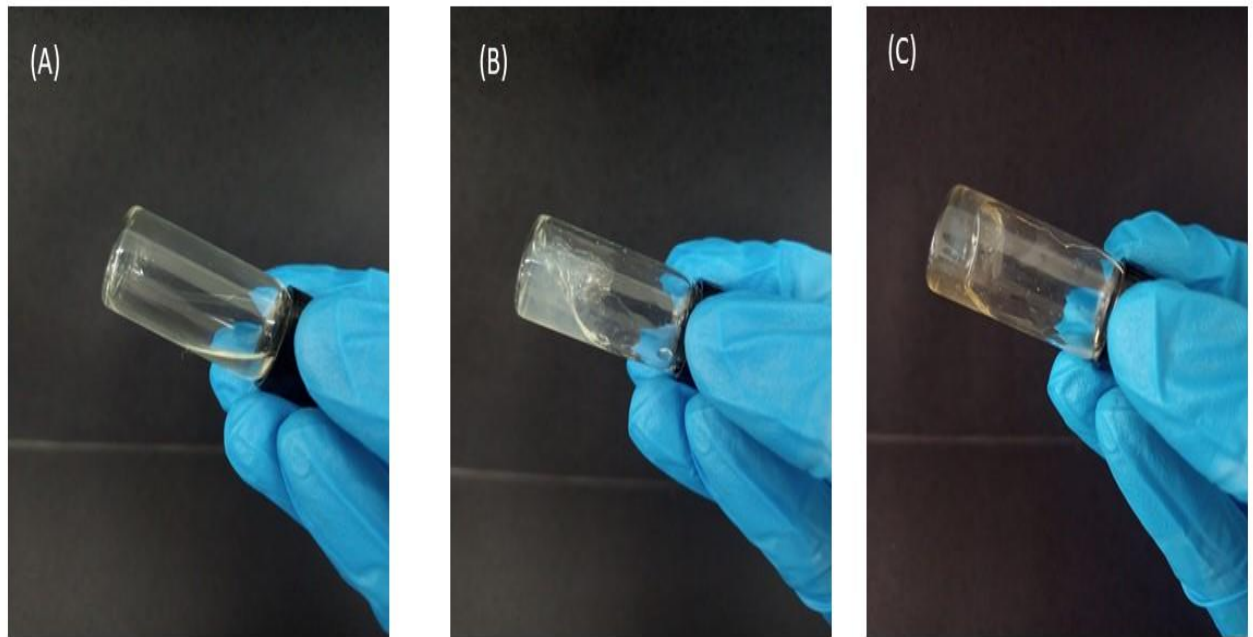


Figura 39. alginato (A), alginato-cisteína (B) e alginato- CaCl_2 (C).
Fonte: elaborada pela própria autora.

A reologia estuda o comportamento de fluxo e deformação de materiais complexos, como soluções poliméricas, quando submetidos a forças de cisalhamento ou tensão. Isto inclui compreender como estes materiais respondem quando sujeitos a diferentes taxas de deformação ou tensão, bem como como as suas propriedades mudam sob diferentes condições, tais como temperatura e concentração. A análise reológica permite determinar as propriedades viscoelásticas, como viscosidade e elasticidade (LIU *et al.*, 2018).

As propriedades viscoelásticas das amostras em estudo foram investigadas no reômetro. A Figura 40-A mostra o comportamento das amostras em diferentes taxas de cisalhamento e explora a influência da reticulação na viscosidade dos polímeros. O alginato não modificado apresentou menor viscosidade quando comparado aos reticulados. Alginato-Cys apresentou a maior viscosidade. As três amostras apresentaram comportamento pseudoplástico, ou seja, à medida que a taxa de cisalhamento aumentou, a viscosidade diminuiu relativamente (ESKENS; VILLANI; AMIN, 2020), provavelmente devido à quebra estrutural das ligações fracas internas dos polímeros, o que contribuiu para a diminuição da viscosidade. A curva de relação entre a tensão de cisalhamento do sistema de gel e a taxa de cisalhamento é mostrada na Figura 40-B, mostrando que com o aumento gradual da taxa de cisalhamento, a

tensão de cisalhamento do sistema de gel aumenta continuamente. Essa característica é observada em todas as amostras analisadas.

A Figura 40-C mostra que G' do alginato é instável. O alginato- CaCl_2 e o alginato-Cys são estáveis a longo prazo. Ao analisar os módulos de armazenamento e perda, percebe-se que o alginato possui características de líquidos viscoelásticos, pois apresentou um G'' maior que G' , indicando um módulo viscoso maior que o módulo elástico, a razão para isso é que o alginato é constituído por moléculas livres e não reticuladas. As amostras de alginato- CaCl_2 e alginato-Cys apresentam o comportamento típico de polímeros reticulados, onde G' é maior que G'' , indicando que possuem módulo de elasticidade superior ao módulo viscoso. Isto se deve às ligações químicas dentro do material; esses polímeros são considerados polímeros viscoelásticos sólidos (ERRAMREDDY; GHOSH, 2014).

Ensaio de varredura de frequência foram realizados para determinar as propriedades mecânicas de materiais viscoelásticos, analisando o módulo G' correspondente ao módulo de armazenamento e o módulo de perda G'' . A análise da combinação de G' e G'' fornece dados sobre o comportamento dos hidrogéis em termos de comportamento newtoniano, comportamento viscoelástico e transição sólido-gel (PUTRI *et al.*, 2023). Assim, de acordo com a Figura 40-D, o alginato apresentou um G'' maior que G' , indicando comportamento semelhante a gel. Por outro lado, o alginato-Cys e o alginato reticulado com cloreto de cálcio apresentaram G' maior que G'' , indicando seu sólido comportamento.

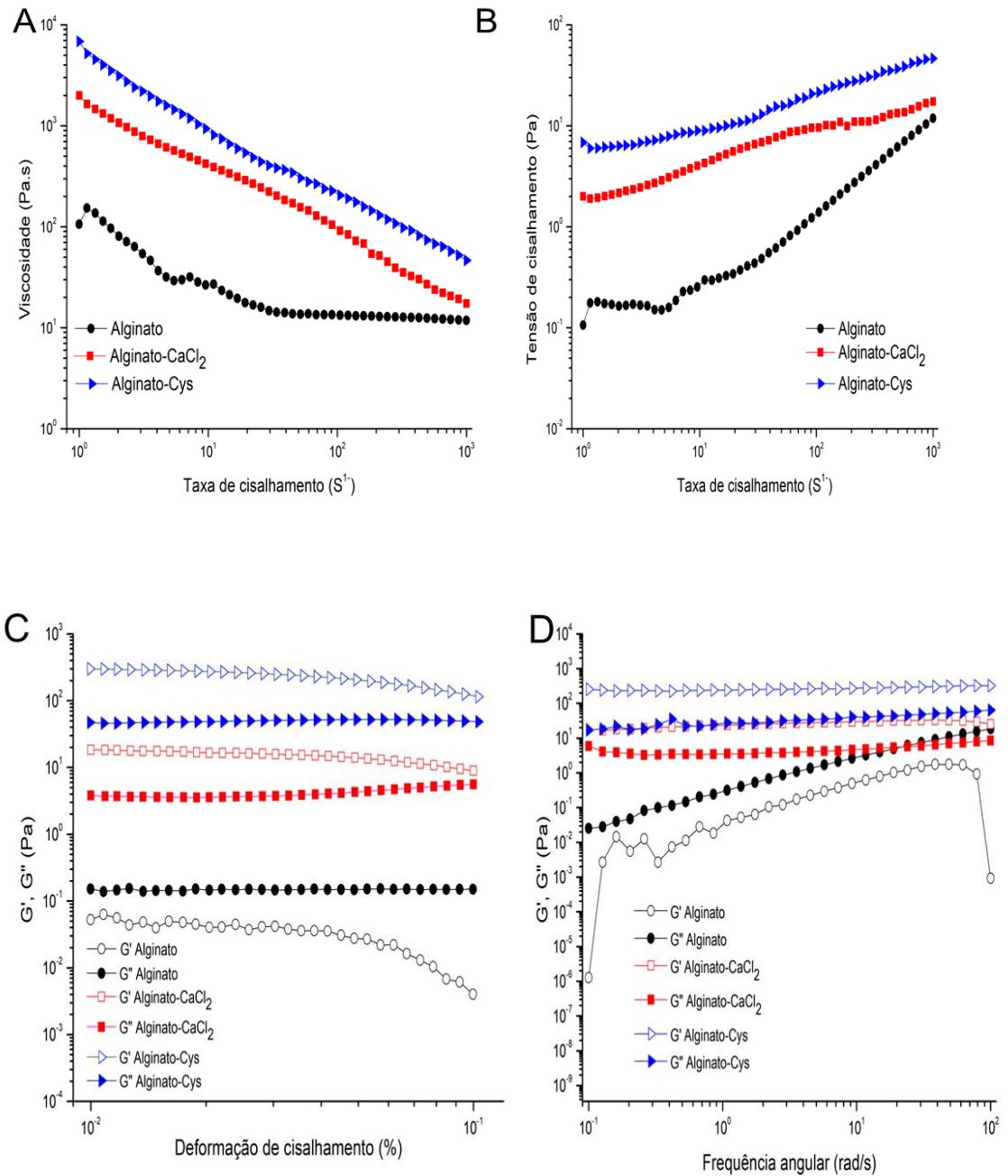


Figura 40. Resultados reológicos das amostras de alginato, alginato-Cys e alginato- $CaCl_2$. Viscosidade em função da taxa de cisalhamento (A), curva de fluxo de tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento (B), módulo de armazenamento e módulo de perda em função da deformação de cisalhamento (C), módulo de armazenamento e módulo de perda em função da frequência angular (D).

Fonte: elaborada pela própria autora.

3.5. Teste de Reticulação

As Figuras 41-A e 41-B evidenciam a reticulação dos materiais analisados, o que denota a formação da estrutura em rede, típica de polímeros reticulados (FUNDARÒ *et al.*, 2022). A Figura 41-C mostra o tubo vazio, indicando que o alginato não reticulado foi solubilizado no teste. As amostras foram secas em estufa com temperatura controlada a 50 °C até atingirem uma massa estável e utilizadas para calcular o teor de reticulação. A amostra de alginato não apresentou evidências de reticulação, indicando falta de estrutura de rede. O alginato-CaCl₂ atingiu um teor de reticulação de cerca de 71,4 %, como esperado, uma vez que o CaCl₂ é o método clássico para reticulação do alginato. Alginato-Cys exibiu um teor notável de reticulação, cerca de 79,1 %. Este resultado sugere que os grupos tiol desempenharam um papel crucial na promoção da formação da estrutura reticulada por meio da formação de pontes dissulfeto (S-S).

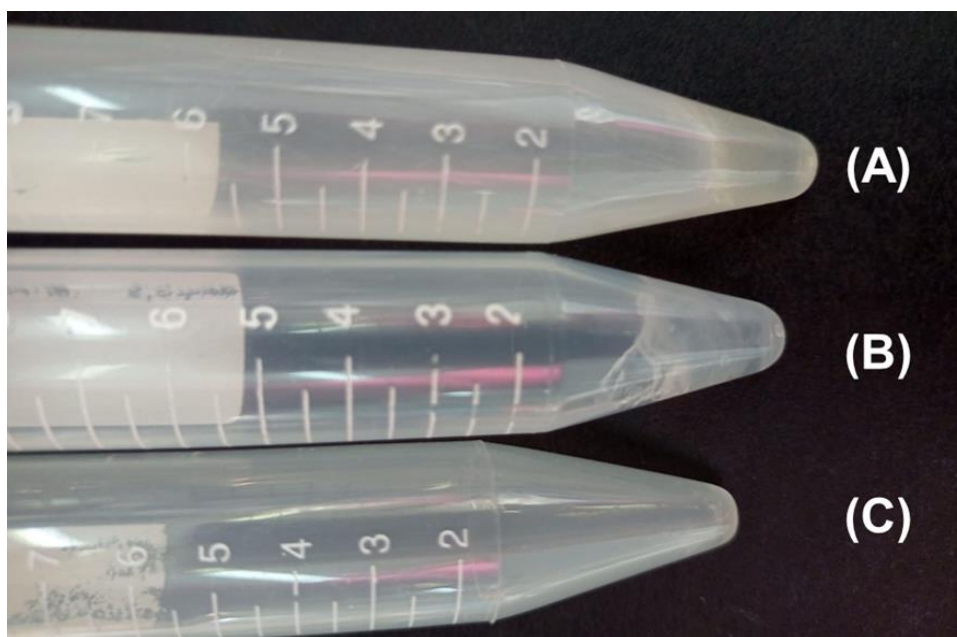


Figura 41. Alginato-Cys (A), alginato-CaCl₂ (B) e Alginato (C).
Fonte: elaborada pela própria autora.

3.6. Degradação Hidrolítica

A Figura 42 mostra os resultados detalhados do teste de degradação das amostras de alginato e alginato-Cys durante um período de 24 h, 15, 30, 45 e 60 dias. Esta análise revela a dinâmica de degradação do alginato não reticulado e reticulado, proporcionando uma compreensão abrangente da estabilidade destes polímeros. Ao

avaliar o comportamento das amostras ao longo de 24 h, verificou-se que o alginato natural apresentou uma degradação de 6,23 %, indicando uma taxa relativamente baixa de perda de massa. Esta baixa cinética de perda de massa pode estar associada à lenta taxa de absorção de água e inchaço pelo alginato. O alginato-Cys apresentou maior perda de massa, cerca de 26,48 %, o que não era esperado, uma vez que polímeros reticulados tendem a se degradar mais lentamente do que polímeros não reticulados (KONG *et al.*, 2004). No entanto, esse resultado foi encontrado apenas nas primeiras 24 h. Este resultado indicou que o alginato não reticulado foi rapidamente solubilizado e a massa seca medida corresponde à contraparte reticulada.

Após 15 dias, a degradação do alginato natural aumentou para 65,76 %, e o alginato-Cys atingiu um teor relativamente inferior de 36,3 %. Este aumento substancial destaca a diferença significativa na estabilidade do polímero não reticulado e reticulado durante um período relativamente curto. Aos 30, 45 e 60 dias, a degradação aumentou gradativamente para ambos os tipos de alginato. O alginato não modificado apresentou taxas de degradação crescentes, atingindo 97,37 %, 98,88 % e 99,83 % aos 30, 45 e 60 dias, respectivamente. Em contrapartida, o alginato-Cys também registou um aumento gradual da degradação, atingindo 40,1%, 41,54% e 43,13 % nos mesmos períodos, revelando uma taxa de degradação relativamente mais estável em comparação com o alginato natural. Estes resultados fornecem uma visão abrangente da degradação do alginato e do alginato-Cys, destacando a influência da modificação química (reticulação) na estabilidade e taxa de degradação destes biomateriais (MAITRA; SHUKLA,, 2014; FUNDARÒ *et al.*, 2022).

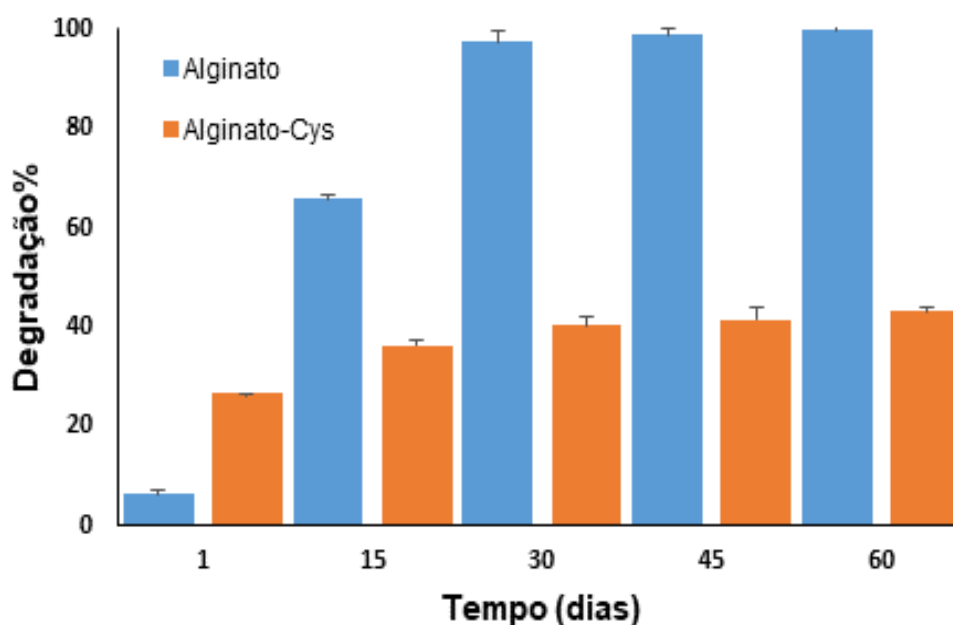


Figura 42. Resultado teste de degradação das amostras de alginato e alginato-cisteína ao longo do período de estudo.

Fonte: elaborada pela própria autora.

3.7. Teste Microbiológico

Este teste avaliou a resposta do alginato, cisteína e alginato-Cys no crescimento bacteriano (Figura- 43). Pode-se observar que o alginato-Cys apresentou atividade inibitória significativa no crescimento de *S. aureus* (Gram positivo), resultando na inibição completa do crescimento bacteriano. Por outro lado, o conjugado alginato-Cys não apresentou atividade contra *E coli* (Gram negativo). Esse achado corrobora com trabalho anterior em que a celulose modificada com cisteína apresentou maior inibição contra *S. aureus* do que *K. pneumoniae* (CALDEIRA *et al.*, 2013). Isto sugere que o conjugado Alginato-Cys tem maior atividade contra bactérias Gram positivas.

As bactérias Gram-positivas são geralmente mais sensíveis aos antimicrobianos do que as bactérias Gram-negativas devido à estrutura da parede celular desses microrganismos. Normalmente, a parede celular das bactérias Gram-negativas é mais complexa, o que resulta em maior resistência desses organismos aos compostos antimicrobianos (LIU *et al.*, 2019). Neste contexto, um estudo que investigou a atividade microbiana do revestimento à base de alginato de sódio com L-cisteína e ácido cítrico em raízes de lótus recém-cortadas descobriu que o número

total de *Pseudomonas*, *Erwinia* e *Bacteroidetes* não classificadas foi significativamente reduzido, prolongando assim a vida útil das fatias de lótu (GOUDA *et al.*, 2021). Estas descobertas enfatizam a importância das modificações químicas, especificamente com a cisteína, na melhoria das propriedades inibitórias do alginato para o crescimento de bactérias patogênicas.

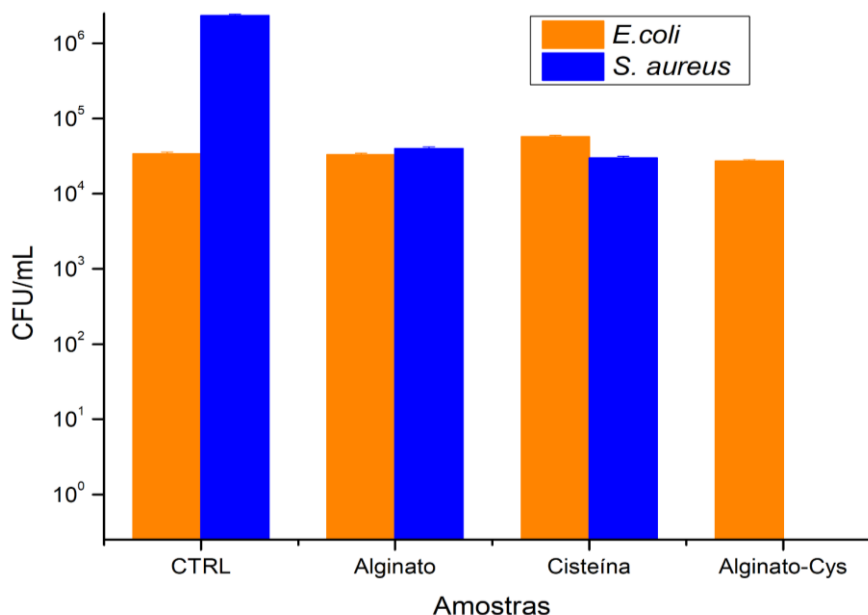


Figura 43. Ensaio microbiológico *E. coli* e *S. aureus*.

Fonte: elaborada pela própria autora.

3.8. Teste de citotoxicidade celular

O teste de citotoxicidade *in vitro* foi realizado utilizando o método baseado em resazurina. Em resumo, o método foi desenvolvido para determinar, espectrofotometricamente ou fluorometricamente, o número de células em função da atividade metabólica utilizando o corante resazurina (Figura- 44 e 45). A metabolização da resazurina por células vivas gera a resorufina fluorescente, que é utilizada para estimar a viabilidade celular por meio da medição da intensidade da fluorescência. De acordo com a norma, uma redução de mais de 30% na viabilidade celular é considerada como tendo efeito citotóxico, sendo necessária uma viabilidade $\geq 70\%$ (DORM *et al.*, 2022; MCMILLIAN *et al.*, 2002) ISO 10993-5 (ANTUNES *et al.*, 2022).

A determinação da viabilidade celular é uma etapa fundamental na avaliação de novos materiais, especialmente aqueles destinados a aplicações biomédicas. Este parâmetro essencial visa avaliar qualquer efeito adverso que os materiais possam ter sobre as células. Para garantir a segurança e a eficácia de um novo material em um ambiente fisiológico, é crucial que ele não seja tóxico para as células. Portanto, esta análise permite determinar se o material é seguro para uso em aplicações biológicas, garantindo que não cause danos às células (DORM *et al.*, 2024).

Os resultados dos testes de citotoxicidade para alginato e alginato-Cys são mostrados na Figura 44, e os resultados para cisteína em diferentes concentrações, na Figura 45. Nenhum efeito citotóxico foi encontrado para nenhuma das amostras testadas, uma vez que a viabilidade celular foi alta ($\geq 70\%$), mesmo na concentração máxima da amostra de cisteína. Isso indica que o conjugado alginato-Cys pode ser usado com segurança em meios fisiológicos.

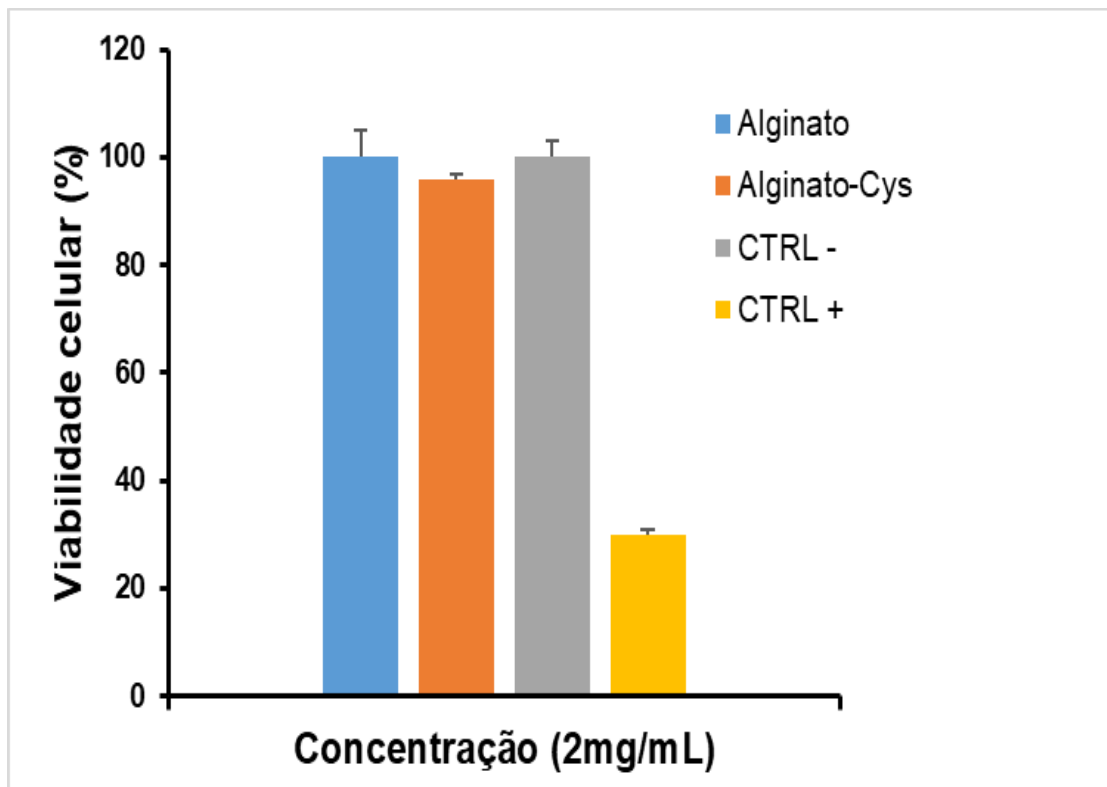


Figura 44. Resultados da viabilidade celular do Alginato e Alginato-Cys.

Fonte: elaborada pela própria autora.

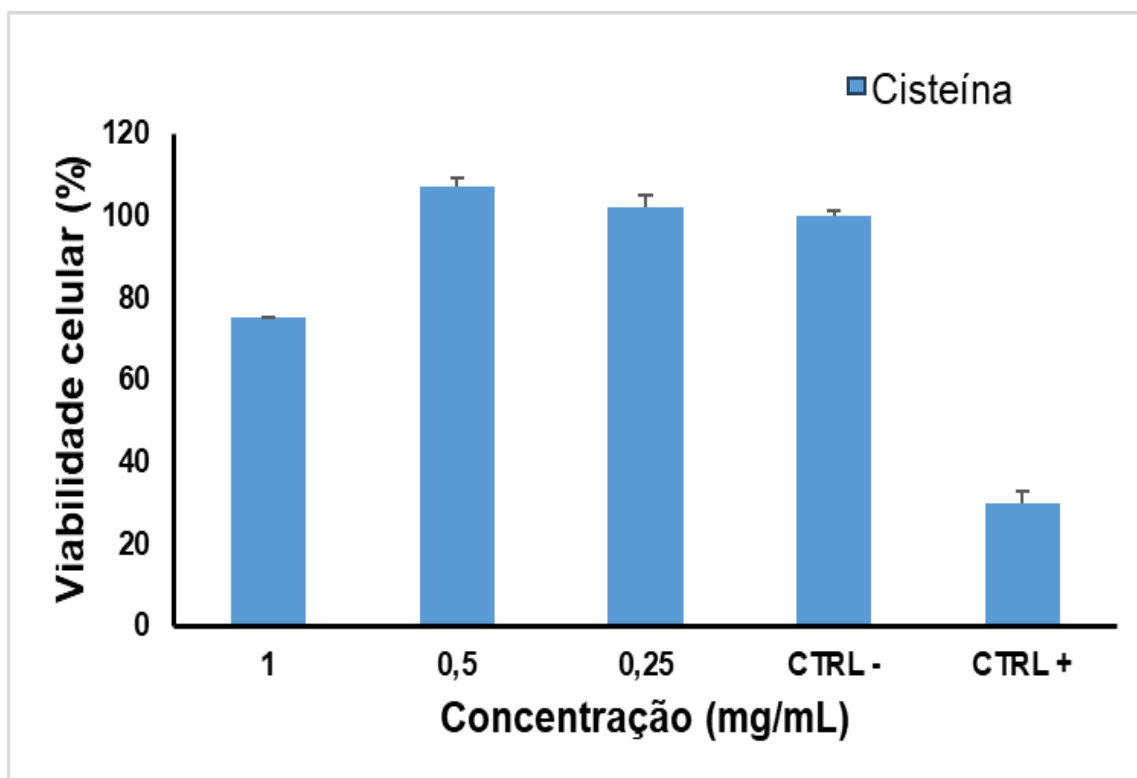


Figura 45. Resultados da viabilidade celular da Cisteína em diferentes concentrações.

Fonte: elaborada pela própria autora.

4. CONCLUSÃO

Neste estudo mostramos uma aplicabilidade inexplorada do novo bioconjugado alginato-Cys, a sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano. Os resultados da caracterização química indicaram o sucesso da reação, conforme demonstrado por FTIR e $^1\text{H-RMN}$, análise térmica e reologia. Os resultados desta pesquisa demonstram o grande potencial deste novo biomaterial para uso em aplicações biomédicas. Ao investigar a sua atividade antimicrobiana, avaliamos a sua eficácia antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o que é crucial para o desenvolvimento de curativos e outros dispositivos médicos destinados à prevenção de infecções.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIRNEJAT, S.; NOSRATI, A.; JAVANSHIR, S. Superparamagnetic Fe₃O₄@ Alginate supported L-arginine as a powerful hybrid inorganic–organic nanocatalyst for the one-pot synthesis of pyrazole derivatives. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 34, n. 10, p. e5888, 2020.

ANKIREDDY, S. R.; KIM, J.. Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid via fluorescence quenching of InP/ZnS quantum dots. **International journal of nanomedicine**, v. 10, n. sup1, p. 113-119, 2015.

ANTUNES, B. F. et al. Crosslinking starch with Diels–Alder reaction: water-soluble materials and water-mediated processes. **Polymer International**, v. 71, n. 11, p. 1340-1346, 2022.

BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; KAST, C. E.; RICHTER, M. F. Improvement in the mucoadhesive properties of alginate by the covalent attachment of cysteine. **Journal of controlled release**, v. 71, n. 3, p. 277-285, 2001.

CAILLOL, S. Special Issue “Natural Polymers and Biopolymers II”. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 112, 2020.

CALDEIRA, E. et al. Biofunctionalization of cellulosic fibres with L-cysteine: assessment of antibacterial properties and mechanism of action against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of biotechnology**, v. 168, n. 4, p. 426-435, 2013.

CAO, Z. et al. Antibacterial hybrid hydrogels. **Macromolecular Bioscience**, v. 21, n. 1, p. 2000252, 2021.

CHUDASAMA, N. A. et al. Seaweed polysaccharide based products and materials: an assessment on their production from a sustainability point of view. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2608, 2021.

DORM, B. C. et al. Synthesis and biological properties of alanine-grafted hydroxyapatite nanoparticles. **Life**, v. 13, n. 1, p. 116, 2022.

DORM, B. C. et al. Synthesis of a cysteine Diels–Alder-based polymer by simultaneous double-click chemistry and its cyto-genotoxicity evaluation. **Macromolecular Research**, v. 32, n. 2, p. 133-144, 2024.

DORM, B. C. et al. Lysine grafted poly (lactic acid): An intrinsically antimicrobial polymer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 273, p. 133181, 2024.

ELBAYOMI, S. M. et al. Enhancement of antioxidant and hydrophobic properties of alginate via aromatic derivatization: Preparation, characterization, and evaluation. **Polymers**, v. 13, n. 15, p. 2575, 2021.

ERRAMREDDY, V. V.; GHOSH, S. Influence of emulsifier concentration on nanoemulsion gelation. **Langmuir**, v. 30, n. 37, p. 11062-11074, 2014.

ESKENS, O.; VILLANI, G.; AMIN, S. Rheological investigation of thermoresponsive alginate-methylcellulose gels for epidermal growth factor formulation. **Cosmetics**, v. 8, n. 1, p. 3, 2020.

FRANK, A. et al. A biomolecule-assisted, cost-efficient route for growing tunable CuInS 2 films for green energy application. **RSC advances**, v. 7, n. 33, p. 20219-20230, 2017.

FUNDARÒ, S. P. et al. The rheology and physicochemical characteristics of hyaluronic acid fillers: Their clinical implications. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 18, p. 10518, 2022.

GANESAN, P. Natural and bio polymer curative films for wound dressing medical applications. **Wound medicine**, v. 18, p. 33-40, 2017.

GENG, Y. et al. pH window for high selectivity of ionizable antimicrobial polymers toward bacteria. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 15, n. 18, p. 21781-21791, 2023.

GOUDA, M. H. B. et al. Combination of sodium alginate-based coating with L-cysteine and citric acid extends the shelf-life of fresh-cut lotus root slices by inhibiting browning and microbial growth. **Postharvest Biology and Technology**, v. 175, p. 111502, 2021.

GOMATHI, T. et al. Size optimization and thermal studies on calcium alginate nanoparticles. GOMATHI, T. et al. Size optimization and thermal studies on calcium alginate nanoparticles. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 48, p. 1-7, 2017., v. 48, p. 1-7, 2017.

HUAMANI-PALOMINO, R. G. et al. Chemical modification of alginate with cysteine and its application for the removal of Pb (II) from aqueous solutions. **International journal of biological macromolecules**, v. 129, p. 1056-1068, 2019.

HUAMANI-PALOMINO, R. G. et al. Functionalization of an alginate-based material by oxidation and reductive amination. **Polymers**, v. 13, n. 2, p. 255, 2021.

KONG, H. J. et al. Controlling degradation of hydrogels via the size of cross-linked junctions. **Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)**, v. 16, n. 21, p. 1917, 2004.

LETEK, M. Alexander Fleming, The discoverer of the antibiotic effects of penicillin. **Behind a great medical drug there is always a great scientist**, p. 64, 2023.

LI, M. et al. Conjugation of RAFT-generated polymers to proteins by two consecutive thiol–ene reactions. **Polymer Chemistry**, v. 1, n. 6, p. 854-859, 2010.

LINS, A. C. A. et al. Effect of hydrocolloids on the physicochemical characteristics of yellow mombin structured fruit. **Food Science and Technology**, v. 34, p. 456-463, 2014.

LIU, J. et al. Progress in antibacterial hydrogel dressing. **Gels**, v. 8, n. 8, p. 503, 2022.

LIU, Y. et al. Antibiotic adjuvants: an alternative approach to overcome multi-drug resistant Gram-negative bacteria. **Critical reviews in microbiology**, v. 45, n. 3, p. 301-314, 2019.

LIU, Q. et al. Preparation and properties of 3D printed alginate–chitosan polyion complex hydrogels for tissue engineering. **Polymers**, v. 10, n. 6, p. 664, 2018.

MAITRA, J.; SHUKLA, V. K. Cross-linking in hydrogels-a review. **American Journal of Polymer Science**, v. 4, n. 2, p. 25-31, 2014.

MALEKTAJ, H.; DROZDOV, A. D.; DECLAVILLE, C. J. Mechanical properties of alginate hydrogels cross-linked with multivalent cations. **Polymers**, v. 15, n. 14, p. 3012, 2023.

MAO, X. et al. Development of microspheres based on thiol-modified sodium alginate for intestinal-targeted drug delivery. **ACS Applied Bio Materials**, v. 2, n. 12, p. 5810-5818, 2019.

MARCANO, Y. C.; SABINO, M. A. Chemical modification of alginate with L-cysteine to extend its use in drug delivery systems. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 52, p. 559-567, 2018.

MATICA, M. A. et al. Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 23, p. 5889, 2019.

MCMILLIAN, M. K. et al. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. **Cell biology and toxicology**, v. 18, p. 157-173, 2002.

MOHAMED, F.; AHMED, A.; ABDEL-GAWAD, O. F. Preparation and evaluation of the antimicrobial activity of sodium alginate-grafted diphenylamine embedded with silver nanoparticles. **Polymer Bulletin**, v. 80, n. 9, p. 9797-9810, 2023.

MUÑOZ-BONILLA, A. et al. Bio-based polymers with antimicrobial properties towards sustainable development. **Materials**, v. 12, n. 4, p. 641, 2019.

NAEIMIPOUR, S. et al. Enzymatically triggered deprotection and cross-linking of thiolated alginate-based bioinks. **Chemistry of Materials**, v. 34, n. 21, p. 9536-9545, 2022.

ORE, Y.; PICHILINGUE, E. R.; VALDERRAMA NEGRÓN, A. C. Extracción y caracterización del alginato de sodio de la macroalga *Macrocystis pyrifera*. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 86, n. 3, p. 276-287, 2020.

PEREIRA, R. et al. Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 52, p. 221-230, 2013.

PÉREZ, L. A. et al. Granular disulfide-crosslinked hyaluronic hydrogels: a systematic study of reaction conditions on thiol substitution and injectability parameters. **Polymers**, v. 15, n. 4, p. 966, 2023.

PLUMET, L. et al. Bacteriophage therapy for staphylococcus aureus infections: a review of animal models, treatments, and clinical trials. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 907314, 2022.

PUTRI, A. P. et al. Rheological and Self-Healing Behavior of Hydrogels Synthesized from L-Lysine-Functionalized Alginate Dialdehyde. **Polymers**, v. 15, n. 4, p. 1010, 2023.

RAUS, R. A.; NAWAWI, W. M. F.; NASARUDDIN, R. R. Alginate and alginate composites for biomedical applications. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 3, p. 280-306, 2021.

REAKASAME, S.; BOCCACCINI, A. R. Oxidized alginate-based hydrogels for tissue engineering applications: a review. **Biomacromolecules**, v. 19, n. 1, p. 3-21, 2018.

RHIM, J.. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. **LWT-Food science and technology**, v. 37, n. 3, p. 323-330, 2004.

SANCHEZ-BALLESTER, N. M.; BATAILLE, B.; SOULAIROL, I. Sodium alginate and alginic acid as pharmaceutical excipients for tablet formulation: Structure-function relationship. **Carbohydrate Polymers**, v. 270, p. 118399, 2021.

SAJI, S. et al. A brief review on the development of alginate extraction process and its sustainability. **Sustainability**, v. 14, n. 9, p. 5181, 2022.

SHI, S. et al. Sustained release of alginate hydrogel containing antimicrobial peptide Chol-37 (F34-R) in vitro and its effect on wound healing in murine model of *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Journal of Veterinary Science**, v. 24, n. 3, 2023.

SUHAIL, M. et al. Preparation of pH-responsive hydrogels based on chondroitin sulfate/alginate for oral drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, p. 2110, 2022.

TAHA, M. O. et al. Synthesis of zinc-crosslinked thiolated alginic acid beads and their in vitro evaluation as potential enteric delivery system with folic acid as model drug. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 10, p. 736-742, 2005.

TAO, B. et al. Copper-nanoparticle-embedded hydrogel for killing bacteria and promoting wound healing with photothermal therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 15, p. 2534-2548, 2019.

TAO, L. et al. A review on the chemical modification of alginates for food research: Chemical nature, modification methods, product types, and application. **Food Hydrocolloids**, p. 109338, 2023.

UDOMSOM, S. et al. Novel rapid protein coating technique for silicon photonic biosensor to improve surface morphology and increase bioreceptor density. **Coatings**, v. 11, n. 5, p. 595, 2021.

VASUDEVAN, U. M.; LEE, O. K.; LEE, E. Y. Alginate derived functional oligosaccharides: Recent developments, barriers, and future outlooks. **Carbohydrate Polymers**, v. 267, p. 118158, 2021.

XIE, Y. et al. Alginate microfibers as therapeutic delivery scaffolds and tissue mimics. **Experimental Biology and Medicine**, v. 247, n. 23, p. 2103-2118, 2022.

WEI, S. et al. Bacterial synthesis of PbS nanocrystallites in one-step with L-cysteine serving as both sulfur source and capping ligand. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1216, 2021.

ZHANG, B.; LAN, W.; XIE, J. Chemical modifications in the structure of marine polysaccharide as serviceable food processing and preservation assistant: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 223, p. 1539-1555, 2022.