



GIOVANA MARIA GENEVRO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE
GLUCOMANANA PARA APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL**

CAMPINAS

2013



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

GIOVANA MARIA GENEVRO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE
GLUCOMANANA PARA APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL**

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu

Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA GIOVANA MARIA GENEVRO
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARISA MASUMI BEPPU

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Elizângela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

G286o Genevro, Giovana Maria, 1988-
Obtenção e caracterização de hidrogéis de glucomanana para aplicação como biomaterial / Giovana Maria Genevro. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Marisa Masumi Beppu.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Biomateriais. 2. Biopolímeros. 3. Polissacarídeos. 4. Hidrogel. I. Beppu, Marisa Masumi, 1975-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Preparation and characterization of glucomannan hydrogels for application as biomaterial

Palavras-chave em inglês:

Biomaterial
Biopolymer
Polysaccharides
Hydrogel

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Mestra em Engenharia Química

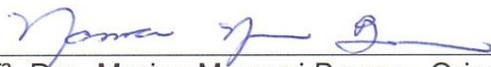
Banca examinadora:

Marisa Masumi Beppu [Orientador]
Marcos Akira d'Ávila
Celso Aparecido Bertran

Data de defesa: 10-12-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Giovana Maria Genevro e aprovada em 10 de dezembro de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof.^a. Dra. Marisa Masumi Beppu - Orientadora



Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila



Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran

Para a minha família, em especial aos meus
queridos pais e ao meu namorado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Lovani e Carlos, pelo apoio incondicional, incentivo, amor e carinho durante a realização deste trabalho. Minha eterna gratidão por todo o esforço em me proporcionar uma boa formação.

Ao Fer, por dividir comigo todos os momentos de angústia e também de realizações durante esse período.

À professora Marisa Masumi Beppu, pela orientação, amizade e pelas oportunidades que tem me oferecido.

À Mariana Agostini de Moraes, pela amizade e ajuda constante e incansável.

Aos professores Theo Guenter Kieckbusch e Ângela Maria Moraes, pelas sugestões e correções para a finalização deste trabalho.

Ao professor Theo Guenter Kieckbusch e ao professor Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo (FCF/USP), por terem disponibilizado seus laboratórios para a realização dos testes mecânicos e das análises de congelamento, respectivamente. Agradeço também a Dra. Camila F. Borgognoni e ao técnico Alexandre M. Rodrigues pelos conselhos e auxílio na realização das análises de criogelificação.

À aluna Lamia Zuñiga Liñan, pelo auxílio com as análises de reologia.

Aos técnicos Rafaela C. Mendes (FEQ/UNICAMP), Claudenete Vieira Leal (DEM/FEM/UNICAMP) e Disney Thomazelli (DEMBio/FEQ/UNICAMP), pelas análises de DRX, MEV e análises térmicas, respectivamente.

A todos os colegas do LEQUIP.

Aos amigos e colegas da FEQ, em especial a Karine, Uni, Alan, Carol e Ju pelo companheirismo e bons momentos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

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

RESUMO

A busca incansável por qualidade de vida e longevidade torna necessário o desenvolvimento de novos materiais e tecnologias para uso médico. A engenharia tecidual é uma área de pesquisa recente que tem a finalidade de desenvolver materiais para substituir ou regenerar tecidos. Esses materiais devem apresentar uma série de características, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência mecânica e porosidade. Dentre os materiais que vem sendo estudados para essa finalidade se destacam os polímeros naturais, em especial alguns polissacarídeos. Portanto, nesse estudo utilizou-se o polissacarídeo glucomanana de konjac (KGM), que é um biopolímero promissor, porém ainda pouco estudado para aplicação como *scaffold*, para a engenharia tecidual. A técnica de criogelificação é uma técnica interessante para modificar a morfologia dos hidrogéis, assim como aumentar a resistência mecânica dos mesmos. Para o preparo do hidrogel foram verificados os efeitos das variáveis, temperatura, concentração do polímero e concentração do agente alcalino. Os hidrogéis foram congelados a diferentes taxas de resfriamento e a temperaturas diferentes, sendo que a taxa é o fator mais relevante. O hidrogel com composição de 2 % de KGM, concentração da solução de Ca(OH)_2 de 0,2 mol/L e temperatura de preparo de 65 °C apresentou consistência e propriedades próximas das quais se buscava. O congelamento lento apresentou estrutura com poros maiores, o que é interessante para a aplicação como biomaterial, pois as células precisam de espaço suficientemente grande para se desenvolverem. Os hidrogéis submetidos ao congelamento são cerca de quatro vezes mais resistentes à compressão do que os hidrogéis não congelados. Além disso, notou-se que a gelificação da KGM é lenta, sendo possível reduzir esse tempo com o processo de criogelificação.

ABSTRACT

The relentless pursuit of quality of life and longevity makes necessary the development of new materials and technologies for medical use. Tissue engineering is a recent area of research that aims to develop materials to replace or regenerate tissues. These materials should present a range of characteristics, including biocompatibility, biodegradability, mechanical strength and porosity. Among the materials that have been studied for this purpose we highlight the natural polymers, especially some polysaccharides. Therefore, in this study we used the polysaccharide konjac glucomannan (KGM) which is a promising biopolymer, but poorly studied for use as a scaffold for tissue engineering. For the preparation of the hydrogel, the effects of the variables, temperature, polymer concentration and concentration of alkali were observed. The hydrogel composition of 2% KGM, the solution concentration of Ca(OH)_2 0,2 mol/L and preparation temperature of 65 °C showed consistency and properties of which are close sought. The cryogelation technique is an interesting technique to modify the morphology of the hydrogels, as well as increase the mechanical strength. The hydrogels were frozen at different cooling rates and different temperatures and the rate is the most relevant factor. The slow freezing showed structure with larger pores, which is interesting for application as biomaterial because the cells need space large enough to develop. The hydrogels subjected to freezing were about four times more resistant to compression. In addition, it was noted that gelation of KGM is slow, then it is possible to reduce this time using the cryogelation process.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Engenharia Tecidual	4
3.2 Géis	6
3.2.1 Viscoelasticidade.....	8
3.2.2 Criogelificação	9
3.2.2.1 Transições térmicas	12
3.3 Glucomanana	13
3.4 Mecanismo de gelificação da KGM	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Caracterização da KGM quanto a massa molecular	19
4.2 Preparo dos hidrogéis de KGM	20
4.2.1 Composição das amostras	20
4.2.2 Medidas das propriedades reológicas.....	22
4.2.3 Comportamento e a estabilidade térmica dos hidrogéis.....	22
4.2.3.1 Termogravimetria (TGA)	22
4.2.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	22
4.2.3.3 Criomicroscopia óptica.....	22
4.3 Cinética de gelificação	23

4.4 Criogelificação	23
4.4.1 Efeito da taxa de congelamento	23
4.4.2 Efeito da temperatura de congelamento	24
4.4.3 Caracterização dos hidrogéis.....	24
4.4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	24
4.4.3.2 Teste de compressão confinada	24
5 RESULTADOS	25
5.1 Caracterização da KGM quanto a massa molecular	25
5.2 Obtenção dos hidrogéis de KGM.....	25
5.2.2 Teste de reologia	26
5.2.3 Termogravimetria (TGA).....	34
5.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	35
5.2.5 Criomicrografia óptica	38
5.3 Cinética de gelificação.....	38
5.4 Criogelificação	42
5.4.1 Efeito da taxa de congelamento	43
5.4.2 Efeito da temperatura de congelamento	45
6 DISCUSSÃO FINAL	50
7 CONCLUSÃO.....	52
8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
APÊNDICE A - Diagramas de Pareto.....	63
APÊNDICE B – Massa Molecular	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo da engenharia tecidual..	5
Figura 2 – Esquema do método de criogelificação.....	10
Figura 3 – Microscopia óptica das soluções dos polissacarídeos quitosana (CHI), alginato (AL) e carboximetilcelulose (CMC), preparadas usando taxas de congelamento rápida (FC) e lenta (SC).	11
Figura 4 – Estrutura de poros formados para soluções de alginato nas diferentes taxas (FC: congelamento rápido; SC: congelamento lento) e temperaturas de congelamento.....	12
Figura 5 – Imagens (a) Planta <i>Amorphophallus Konjac C. Koch</i> com 17 semanas.	14
Figura 6 – Estrutura da KGM.	15
Figura 7 – Esquema do mecanismo de gelificação da glucomanana.	17
Figura 8 – Efeitos da adição de álcali na estrutura da KGM.....	18
Figura 9 – Variação do módulo elástico dos hidrogéis de KGM em função da frequência.	27
Figura 10 – Variação do módulo viscoso dos hidrogéis de KGM em função da frequência.	28
Figura 11 – Fotos do hidrogel de glucomanana com 10 dias, obtido no ponto central (Concentração de KGM = 2 %; Concentração da solução Ca(OH)_2 = 0,2 mol/L; Temperatura = 65 °C).....	34
Figura 12 – Análise termogravimétrica (TGA) e curva da massa residual diferencial (DTGA) do hidrogel de KGM liofilizado.	35
Figura 13 – Termograma obtido por DSC para o hidrogel de glucomanana no modo (a) resfriamento e b) aquecimento.	36

Figura 14 – Áreas utilizadas para o cálculo da entalpia utilizando o termograma obtido por DSC. 37	
Figura 15 – Micrografias ópticas do hidrogel de glucomanana durante o congelamento nas temperaturas (a) -15,9 °C e (b) -17,3 °C.	38
Figura 16 – Difratomogramas de raios X para o hidrogel de KGM.	40
Figura 17 – Difrátograma de raios X para o hidrogel de KGM após congelamento.	41
Figura 18 – Micrografias obtidas por MEV para fratura do (a) hidrogel criogelificado e (b) hidrogel mantido em geladeira.	42
Figura 19 – Resultados do teste de compressão confinada para avaliação do efeito do congelamento.	43
Figura 20 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da fratura de hidrogéis de glucomanana resultantes de a) congelamento lento (2,5 °C/min) e b) congelamento rápido (30°C/min).	44
Figura 21 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da fratura de hidrogéis resultantes de congelamento nas temperaturas a) -8 °C, b) -18 °C e c) -28 °C.	46
Figura 22 – Curva típica de tensão-deformação dos hidrogéis de KGM.	47
Figura 23 – Resultado do teste de compressão confinada dos hidrogéis de KGM mantidos por diferentes tempos nas temperaturas de congelamento avaliadas.	48
Figura A.1 – Diagrama de Pareto dos efeitos do planejamento fatorial para o módulo elástico a 1 Hz.	63
Figura A.2 – Diagrama de Pareto dos efeitos do planejamento fatorial para o módulo elástico a 10 Hz.	64

Figura A.3 – Diagrama de Pareto dos efeitos do planejamento fatorial para o módulo viscoso a 1 Hz.	64
Figura A.4 – Diagrama de Pareto dos efeitos do planejamento fatorial para o módulo viscoso a 10 Hz.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela de níveis dos fatores estudados no processo de formação do hidrogel de glucomanana, considerando concentração de KGM, concentração de hidróxido de cálcio e temperatura como fatores do estudo.	20
Tabela 2 – Composição dos hidrogéis de glucomanana preparados de acordo com o planejamento experimental.	21
Tabela 3 – Aspecto visual das amostras de hidrogel de KGM logo após o preparo.	26
Tabela 4 – Valores dos módulos G' e G'' dos hidrogéis de glucomanana do planejamento experimental	29
Tabela 5 – Tabela de efeitos para o módulo elástico a 1 Hz.	29
Tabela 6 – Tabela de efeitos para o módulo elástico a 10 Hz	30
Tabela 7 – Tabela de efeitos para o módulo viscoso (G'') a 1 Hz.	32
Tabela 8 – Tabela de efeitos para o módulo viscoso a 10 Hz.	32

1 INTRODUÇÃO

A busca por patamares elevados de qualidade de vida, principalmente quando se diz respeito à área da saúde, é comum entre os seres humanos. Portanto tecnologias diferenciadas para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de materiais artificiais para uso médico se fazem necessárias (Langer e Tirrell, 2004; Zhu, 2010).

Tecnologias biomédicas e farmacêuticas emergentes necessitam de materiais que apresentem elevados níveis de biocompatibilidade e biodegradabilidade, características que os polímeros naturais (polissacarídeos e proteínas) exibem, diferentemente de diversos polímeros sintéticos (Gil, Spontak e Hudson, 2005).

Hidrogéis, polímeros tridimensionais estabilizados por ligações químicas ou físicas, são considerados importantes para aplicações como biomateriais, principalmente na engenharia tecidual, pois possuem capacidade de reagir a estímulos externos, assim como mimetizar tecidos biológicos. Além disso, são aptos a absorver grande quantidade de água, porém mantendo sua integridade estrutural (Ratner *et al.*, 2004; Gil, Spontak e Hudson, 2005; Wang *et al.*, 2008; Mandal, Kapoor e Kundu, 2009). Os mecanismos de gelificação de polissacarídeos têm sido amplamente estudados devido à importância não só científica, mas para possíveis aplicações em diversas áreas industriais, tais como alimentos, cosméticos, farmacêutica, química, bioquímica, etc. (Zhang, Xie e Gan, 2005; Yin *et al.*, 2008).

Além disso, as propriedades mecânicas de um material a ser aplicado como *scaffold* são de extrema importância para o sucesso da aplicação. Esses materiais tem a finalidade de dar suporte biológico e mecânico para a proliferação celular e conseqüente desenvolvimento do novo tecido. As propriedades mecânicas do material suporte devem ser similares às do tecido a ser substituído. Porém, os polímeros naturais apesar das excelentes propriedades para aplicações como *scaffolds*, possuem limitações quanto às propriedades mecânicas. Em geral, os polímeros naturais apresentam baixa resistência mecânica e elasticidade, sendo necessários métodos para melhorar essas características.

Uma alternativa para melhorar a resistência mecânica de hidrogéis de polímeros naturais é a técnica de criogelificação, na qual o material é congelado com taxa e temperaturas controladas, permitindo um controle da formação dos poros e consequente resistência mecânica.

Dentre os polímeros naturais, os polissacarídeos possuem um papel importante na engenharia tecidual, por apresentarem inúmeras propriedades biológicas benéficas (Muzzarelli *et al.*, 1988). Polissacarídeos como a glucomanana possuem potencial aplicação na engenharia tecidual e necessitam de estudos mais aprofundados a respeito do processamento e propriedades destes materiais.

Encontrado nos tubérculos da planta *Amorphophallus konjac C. Koch*, o polissacarídeo glucomanana de konjac (KGM) é um composto neutro, solúvel em água e de elevada massa molecular. Na sua composição apresenta monômeros de manose e glicose, e alguns poucos grupos acetila, que são os responsáveis pela sua solubilidade em água (Nishinari, 2000; Alvarez-Mancenido *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2008).

A desacetilação da KGM promove a formação de um gel, cujas características variam em função de parâmetros físico-químicos, tais como pH, temperatura de processamento e concentração do polissacarídeo (Xu *et al.*, 2007).

A glucomanana é um exemplo de polissacarídeo que tem sido estudado e que vem apresentando excelentes resultados para aplicações como membranas, filmes de revestimento, embalagens e também como matriz de comprimidos e hidrogéis na indústria farmacêutica, além da vasta aplicabilidade no ramo de alimentos (Yin *et al.*, 2008). Nos últimos dois anos, o número de trabalhos utilizando glucomanana teve um grande aumento, mostrando que este material vem se destacando nos estudos já realizados, despertando o interesse da comunidade científica. No Brasil, poucos são os trabalhos realizados utilizando glucomanana.

Este trabalho tem por objetivo a obtenção de um hidrogel a partir da KGM, que apresente características adequadas para ser utilizado como *scaffold* na engenharia tecidual. Apesar da capacidade de formar gel com propriedades mecânicas interessantes e de poder ser utilizada em aplicações médicas, estudos sobre a KGM nesse ramo ainda são incipientes na literatura. De modo geral, não há um consenso sobre a metodologia mais adequada de preparo do

gel de KGM. Ainda, nenhum estudo publicado até hoje buscou verificar a influência do processo de criogelificação nas propriedades dos géis de KGM, o que torna este estudo inédito.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

O objetivo deste trabalho foi a obtenção e a caracterização de hidrogéis de KGM, visando aplicação como biomaterial, bem como o estudo da influência das condições de congelamento nas características do hidrogel.

Objetivos específicos:

- Explorar as condições de preparo do hidrogel de KGM.
- Investigar a cinética de gelificação da KGM.
- Investigar a influência das condições de congelamento na morfologia e nas propriedades mecânicas do gel.
- Caracterizar os hidrogéis de KGM através de análises reológicas, testes de compressão confinada, microscopia eletrônica de varredura e análises térmicas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Engenharia Tecidual

São muitos os ramos de pesquisas que têm interesse em materiais que apresentam propriedades especiais e um deles é a engenharia tecidual. Esses materiais são comumente chamados de biomateriais e são definidos como qualquer substância, natural ou sintética, que pode ser implantada em um organismo por qualquer período de tempo, com a função de melhorar ou substituir tecidos ou órgãos (Williams, 1987). Os biomateriais devem apresentar características adequadas à sua função, sejam elas, propriedades mecânicas, morfológicas, biodegradabilidade, além de sempre serem biocompatíveis (Ratner *et al.*, 2004).

A engenharia tecidual surgiu por volta da década de 90 com o intuito de sanar alguns problemas encontrados nas tradicionais técnicas de reconstrução cirúrgica, tais como reações adversas do organismo, disponibilidade de órgãos no caso de transplantes, a necessidade de um segundo ato cirúrgico seja para remoção, troca ou ajuste da prótese (Langer e Vacanti, 1993; Hollister, 2006).

Para prevenir tais situações, a engenharia tecidual tem a intenção de desenvolver processos para recuperar tecidos e órgãos de maneira que um novo tecido sadio se forme à medida que o *scaffold* (matriz tridimensional porosa) se degrada. O processo consiste em semear células sadias do tecido que se deseja reparar no *scaffold*, cultivar *in vitro*, etapa onde ocorre a adesão celular no material e o início da proliferação e então introduzir no organismo, como uma prótese, que irá se degradar e regenerar o tecido danificado (Figura 1) (Rabkin e Schoen, 2002; Cheung *et al.*, 2007; Liu e Czernuszka, 2007).

Para que o processo seja bem sucedido é altamente desejável que o *scaffold* mimetize a forma e as propriedades do tecido que se está substituindo, pois ele servirá como guia (suporte) para o desenvolvimento do novo tecido, além de apresentar uma série de características necessárias para que as células se desenvolvam, para que os nutrientes consigam chegar até as células e os metabólitos possam ser liberados. Portanto, um dos maiores desafios da engenharia tecidual está no desenvolvimento do *scaffold* (Liu e Czernuszka, 2007).

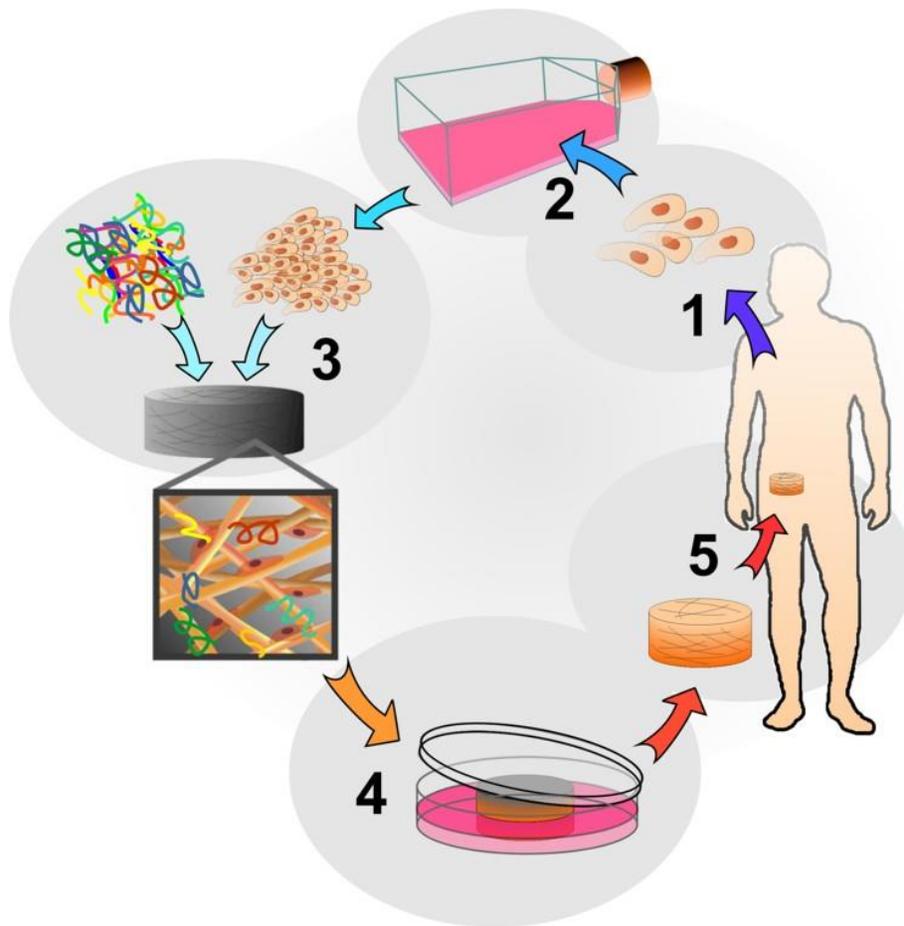


Figura 1 – Ciclo da engenharia tecidual. 1: Coleta de células do paciente. 2: Cultivo e multiplicação das células em laboratório. 3: Semeadura das células no *scaffold* e adição de fatores de crescimento. 4: O *scaffold* semeado é colocado em cultura para proliferação e organização das células em 3D para mimetizar o tecido. 5: O material é implantado no local onde há perda tecidual. Fonte: (George, 2009).

O *scaffold* deve apresentar superfície favorável ao crescimento celular, ser poroso, com porosidade superior a 90%, estrutura de poros interconectados, poros com dimensões da ordem de 100 μm , para que o transporte das células, nutrientes e metabólitos seja possível. As propriedades mecânicas devem ser similares às do tecido original, para que seja capaz de resistir aos esforços que será submetido, além de possuir taxa de degradação compatível com a taxa de formação do novo tecido (Cheung *et al.*, 2007; Liu e Czernuszka, 2007).

São inúmeras as pesquisas que utilizam polímeros naturais para o desenvolvimento de *scaffolds*, pois apresentam condições favoráveis de degradação e propriedades biológicas. O colágeno, por exemplo, é um dos polímeros naturais mais utilizados para esta aplicação, porém devido ao processo de extração e dissolução as interações entre suas moléculas são enfraquecidas. Com isso, materiais obtidos a partir de soluções de colágeno não apresentam boa resistência mecânica, apesar de suas propriedades biológicas serem preservadas (Boccafeschi *et al.*, 2005; Achilli, Lagueux e Mantovani, 2010).

De maneira geral, os materiais devem apresentar resistência à compressão e à tração. A elasticidade, que é a capacidade do material retornar ao seu estado inicial após a remoção da força aplicada, também é uma propriedade essencial para o material a ser usado como suporte. Aplicações como pele, cartilagem, vasos sanguíneos entre outras são exemplos de tecidos que devem ser substituídos por materiais flexíveis, elásticos, resistentes à tração e à compressão.

Dentre os polímeros naturais que são utilizados na engenharia tecidual, se destacam as proteínas, colágeno (Boccafeschi *et al.*, 2005) e fibroína de seda (Harkin *et al.*, 2011), e os polissacarídeos, alginato de sódio (Wang *et al.*, 2011), ácido hialurônico (Kim, Mauck e Burdick, 2011) e quitosana (Venkatesan *et al.*, 2012).

3.2 Géis

Gel é uma rede polimérica reticulada, intumescida em um meio líquido. Sendo que as suas propriedades dependem da interação entre o soluto e o solvente. O líquido sustenta a forma tridimensional da rede polimérica de maneira a não formar uma massa compacta e a rede envolve o líquido de maneira que o líquido não adquira fluência para sair do gel (Kickhofen *et al.*, 1986).

Definir um gel não é tão fácil quanto reconhecê-lo, pois os limites entre solução e gel não são bem nítidos, sendo a passagem sol-gel um processo gradual. O gel apresenta propriedades mecânicas de um sólido, ou seja, ele pode se auto sustentar e manter sua forma sob esforço mecânico (Lloyd, 1926 *apud* Almdal *et al.*, 1993).

Há muitas definições para o processo de gelificação. Em geral, é o processo de transição de sol ou solução de alta massa molar para gel, devido às interações entre as partículas ou sistema

coloidal, perdendo sua habilidade de fluxo. Essa transição ocorre pela ação de um agente reticulante no caso de géis quimicamente reticulados, ou alterações físicas, tais como pH, temperatura, concentração de polímero, entre outros, para o caso de géis fisicamente reticulados. Como resultado da associação dessas cadeias poliméricas, uma estrutura tridimensional em rede é formada, capaz de reter uma grande quantidade de líquido (Whistler e Bemiller, 1999).

Os géis podem ser construídos por polímeros unidos por ligações de hidrogênio, associações hidrofóbicas, ligações iônicas ou covalentes ou o próprio emaranhado das cadeias. Quando a fase líquida de um gel consiste em água ou solução aquosa de componentes de baixa massa molar, esse gel é chamado de hidrogel. Hidrogéis obtidos a partir de polissacarídeos, em alguns casos, podem conter 1% do polímero e reter até 99% de água (Whistler e Bemiller, 1999).

Hidrogéis são materiais muito utilizados como *scaffolds*, pois devido à grande quantidade de água, eles apresentam ampla biocompatibilidade (Kopecek e Yang, 2007). Além disso, são capazes de guiar o crescimento celular e suas propriedades físicas, químicas e biológicas podem ser trabalhadas para que possam desempenhar sua função de maneira satisfatória (Xiao *et al.*, 2011).

Hidrogéis obtidos de polímeros naturais são ainda mais interessantes, pois os polímeros naturais são geralmente compostos por moléculas presentes na matriz extracelular e interagem naturalmente com células, ou seja, são macromoléculas similares as que o ambiente biológico está preparado para reconhecer e metabolizar (Velema e Kaplan, 2006).

Os polímeros naturais apresentam uma série de características desejáveis para uso como *scaffolds*, pois não são tóxicos, são biocompatíveis com uma grande quantidade de células e tecidos, podem ser preparados em diversas formas, e podem apresentar propriedades mecânicas adequadas para diversas aplicações médicas (Abramson *et al.*, 2004).

A concepção de um novo material começa pela consideração do comportamento mecânico. É possível controlar as propriedades mecânicas através de modificações na microestrutura cristalina do material. As propriedades biológicas também podem ser modificadas para realçar a especificidade de tecidos, atividade celular e biocompatibilidade (Maskarinec e Tirrell, 2005; Ma e Xiong, 2008; Yuan *et al.*, 2009).

As propriedades mecânicas mais utilizadas para analisar o comportamento de um material são a resistência à tração, à compressão e as propriedades reológicas. Para o caso de hidrogéis, a resistência à tração é difícil de ser medida, uma vez que a fragilidade inerente dos hidrogéis dificulta seu acoplamento às garras do equipamento para o teste. Por isso, os testes de compressão e reológicos são os mais utilizados para caracterizar mecanicamente os hidrogéis.

3.2.1 Viscoelasticidade

Géis geralmente apresentam comportamento viscoelástico, ou seja, não podem ser diferenciados em sólidos ou líquidos com clareza. O nome viscoelasticidade é justamente atribuído a sistemas que apresentam elasticidade (propriedade dos sólidos) e viscosidade (propriedade dos líquidos) (Shaw, 1975; Rao, 1999).

A deformação e o escoamento sofridos por um material sob a ação de uma força externa são estudados pela reologia. Um material se deforma quando ele está no estado sólido e escoamento quando está no estado líquido (Rao, 1999; Bird, Stewart e Lightfoot, 2005).

Um sólido é um material com dimensões definidas, um material que se auto sustenta. Dentro de certos limites de deformação, o sólido retorna a sua forma original após a remoção da carga aplicada. Já um líquido viscoso, assume a forma do recipiente e o escoamento é irreversível (Schramm, 2006).

As propriedades viscoelásticas dos materiais podem ser determinadas por testes estáticos ou dinâmicos. No caso do teste dinâmico, as propriedades viscoelásticas módulo de armazenamento ou de elasticidade (G') e o módulo de perda ou de viscosidade (G'') podem ser determinadas (Mendieta-Taboada, De Carvalho e Sobral, 2008).

No módulo de armazenamento G' a energia de tensão é temporariamente armazenada durante o teste e pode ser recuperada mais tarde. Já para o módulo de perda G'' , a energia usada para iniciar o escoamento é dissipada, perdida de forma definitiva, transformada em calor de cisalhamento (Schramm, 2006).

Os géis geralmente apresentam propriedades viscosas e elásticas, mas o módulo de armazenamento (G') apresenta valores superiores ao módulo de perda (G''). Quanto maior for o valor de G' , o gel apresentará características mais próximas a um sólido e as deformações serão elásticas ou recuperáveis (Walter, 1998; Rao, 1999).

3.2.2 Criogelificação

Hidrogéis podem ser obtidos através de reticulação química ou física. Hidrogéis químicos são aqueles obtidos pela adição de agentes reticulantes químicos que permitem que as cadeias do polímero se mantenham unidas, pois reagem com grupos específicos da cadeia auxiliando a formação de ligações primárias entre as cadeias poliméricas. Porém este método apresenta a desvantagem de poder liberar agentes tóxicos, tanto pela formação de um componente tóxico na reação, como pelo excesso do agente reticulante (Devine e Higginbotham, 2003; Ma e Xiong, 2008).

Hidrogéis físicos são obtidos, por exemplo, pela técnica de criogelificação (Figura 2), onde os cristalitos formados sustentam as cadeias do polímero, que se ligam por forças eletrostáticas, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou por enovelamento das mesmas. Para aplicações biomédicas a reticulação física é interessante, pelo fato de ser atóxica, apresentar propriedades mecânicas e de intumescimento adequadas (Rosiak *et al.*, 2002; Devine e Higginbotham, 2003).

Segundo Ma e Xiong (2008) que avaliaram o congelamento de géis de polivinil álcool, quando reduz-se a temperatura para valores negativos, o movimento das cadeias se torna restrito, aumentando o tempo de contato entre elas, facilitando o aparecimento de zonas de junção devido, provavelmente, ao enovelamento ou a ligações de pontes de hidrogênio entre as cadeias. Os cristalitos formados nesse processo funcionam como agentes reticulantes, produzindo uma estrutura tridimensional que se mantém estável quando ocorre o descongelamento.

O processo de congelamento/descongelamento vem ganhando espaço como método eficaz de preparação de hidrogéis físicos. Quando se aplicam ciclos de congelamento/descongelamento a interação entre as cadeias poliméricas aumenta porque cada vez que se reduz a temperatura abaixo de 0 °C, surgem mais zonas de junção próximas aquelas já

existentes, tornando o material mecanicamente mais resistente (Kita *et al.*, 1990; Stauffer e Peppas, 1992; Devine e Higginbotham, 2003; Ma e Xiong, 2008).

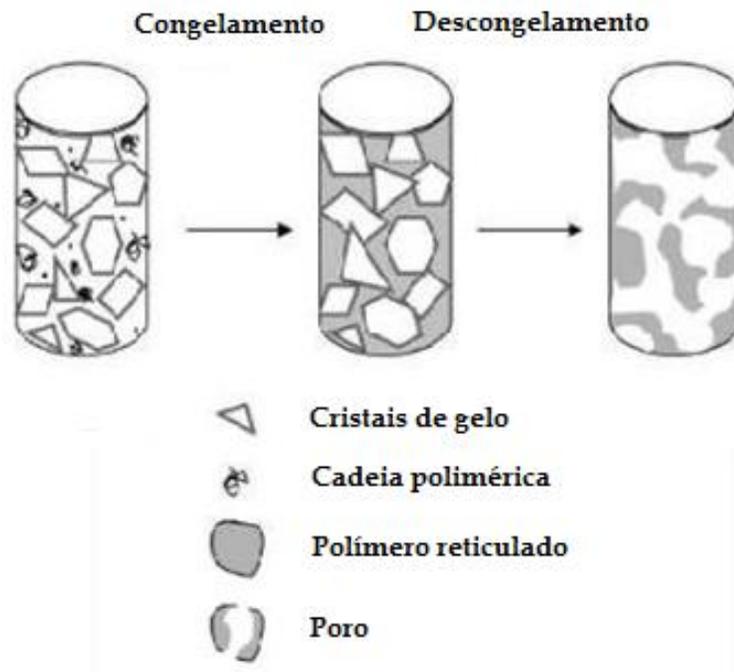


Figura 2 – Esquema do método de criogelificação. Adaptado de Plieva *et al.* (2004).

O congelamento de hidrogéis induz a formação de cristais de gelo, que formam os poros. Dependendo da taxa de congelamento, a formação de poros se dá de maneira diferente, podendo apresentar estrutura uniforme e isotrópica, como também poros alinhados. Além da estrutura, também se consegue poros de tamanhos diferentes, pois quando o congelamento ocorre lentamente os cristais de gelo tem mais tempo para crescer do que quando o processo é rápido, formando poros maiores (Hsieh *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2009).

Yuan *et al.* (2009) estudou a criogelificação de três polissacarídeos e observou que para altas taxas de congelamento a estrutura de poro formado era de poros alinhados, pois os cristais de gelo cresciam em uma única direção, a mesma do gradiente de temperatura. Esses materiais apresentaram uma redução de cerca de três vezes na força de tensão quando comparado com géis congelados lentamente, que apresentavam porosidade uniforme e isotrópica. Na Figura 3 é

possível analisar as diferentes estruturas formadas utilizando taxas de congelamento alta (valores de taxa não especificados) e baixa (0,83 °C/min).

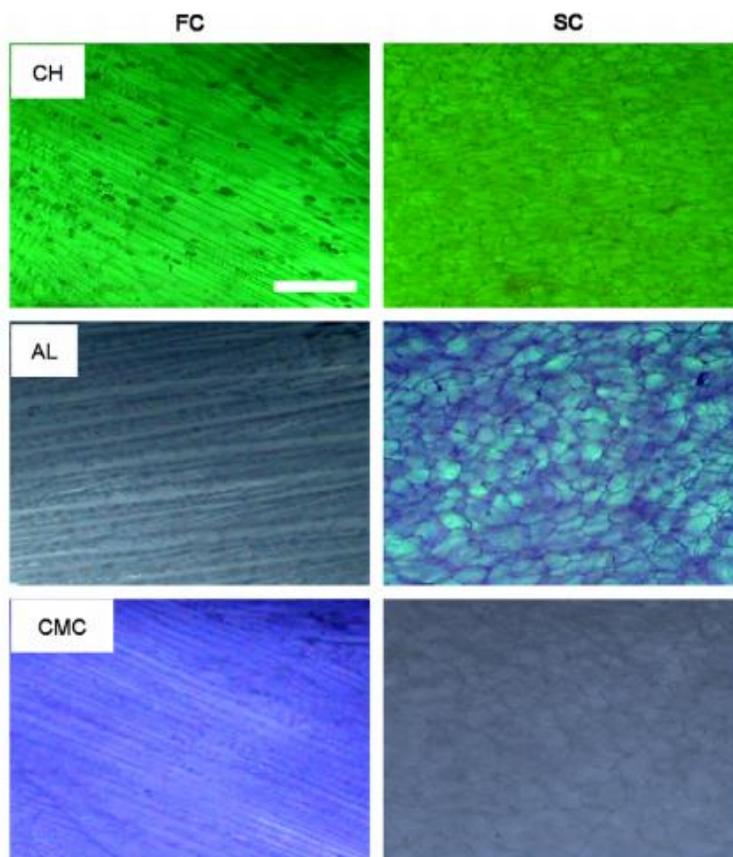


Figura 3 – Microscopia óptica das soluções dos polissacarídeos quitosana (CHI), alginato (AL) e carboximetilcelulose (CMC), preparadas usando taxas de congelamento rápida (FC) e lenta (SC).

Adaptada de Yuan et al. (2009).

Os autores Hsieh et al. (2007) e Yuan et al. (2009), avaliaram diferentes temperaturas (-20, -40, -60 e -80 °C) de congelamento para soluções de polissacarídeos e perceberam que em temperaturas maiores a resistência mecânica era maior e que não havia grande diferença nas dimensões dos poros formados (Figura 4). Os materiais estudados por Yuan et al. (2009) foram desidratados pelo método do ponto crítico para a análise da morfologia.

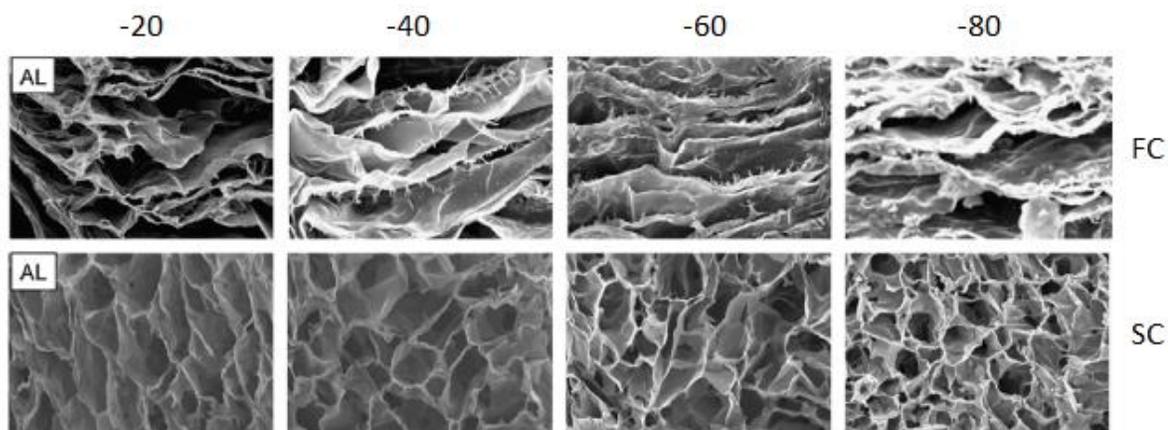


Figura 4 – Estrutura de poros formados para soluções de alginato nas diferentes taxas (FC: congelamento rápido; SC: congelamento lento) e temperaturas de congelamento. Adaptado de Yuan et al. (2009).

3.2.2.1 Transições térmicas

As propriedades físicas dos materiais poliméricos dependem da mobilidade molecular, sendo que a mobilidade das cadeias poliméricas variam de acordo com a temperatura. Então, materiais congelados a diferentes temperaturas podem apresentar características distintas.

Existem três transições térmicas características, que são transição vítrea (T_g), cristalização e fusão dos cristalitos. A cristalização ocorre durante o resfriamento entre as temperaturas de fusão e T_g . A temperatura de cristalização é a temperatura em que ocorre a formação de cristalitos, que pode ser descrito como certa organização espacial das cadeias moleculares (Young e Lovell, 1991).

No resfriamento de um sistema diluído de polímero e água, por exemplo, ocorre a formação de cristais de gelo por nucleação e crescimento e o soluto fica concentrado na microfase não congelável. O tamanho e a quantidade de cristais de gelo dependem da velocidade em que o resfriamento ocorre (Tattini Junior, 2004; Plieva, Galaev e Mattiasson, 2007; Yuan *et al.*, 2009).

Transição vítrea é a transição do estado vítreo (sólido amorfo) para o estado borrachoso. A Tg é uma temperatura menor do que a temperatura de cristalização. Abaixo da Tg, o material está em um estado vítreo, a matriz do soluto assemelha-se a um vidro, que é caracterizado por um sólido rígido. Nos sistemas vítreos, a mobilidade das moléculas é praticamente nula. Em temperaturas acima da Tg o material torna-se borrachoso, a mobilidade molecular aumenta e há uma considerável diminuição da viscosidade (Tattini Junior, 2004).

A temperatura de fusão cristalina é obtida durante o aquecimento do sistema. É a temperatura a qual ocorre a fusão dos cristalitos, o desaparecimento das regiões cristalinas do material (Young e Lovell, 1991).

As temperaturas de transições térmicas de um sistema polissacarídeo e água dependem da quantidade de água e também da taxa de resfriamento/aquecimento. Em altas taxas de resfriamento, por exemplo, a temperatura de cristalização pode ser menor do que quando o resfriamento é lento, pois parte da água permanece no estado sub-resfriado (Prawitwong, Takigami e Phillips, 2007).

A água atua como plastificante, ou seja, aumenta a processabilidade, flexibilidade e extensibilidade do polímero. A nível molecular ocorre a redução da Tg do material.. Então, a água é um forte agente plastificante, sendo a principal responsável pela diminuição da Tg de polissacarídeos. Mesmo em pequenas quantidades, a água pode provocar reduções significativas no valor da Tg (Hatakeyama e Hatakeyama, 1998; Prawitwong, Takigami e Phillips, 2007). A adição de um plastificante provoca mudanças nas propriedades físico-químicas do polímero, ocorre um aumento do espaço intermolecular ou volume livre, diminuindo a viscosidade local e, conseqüentemente, aumentando a mobilidade (Bodmeier e Paeratakul, 1997).

3.3 Glucomanana

Os principais componentes da parede celular da madeira são celulose, hemicelulose e lignina. As hemiceluloses têm muitas variedades e formas físicas e químicas de se ligarem com a celulose e a lignina, sendo que apresentam papel importante na construção das estruturas tridimensionais das paredes das células. Glucomananas são as hemiceluloses mais abundantes em

madeiras moles e representam cerca de 16 a 18% da parede das células lenhosas (Maeda *et al.*, 2000).

A glucomanana, comumente extraída de tubérculos da planta *Amorphophallus Konjac C. Koch* (Figura 5), originária do sudeste da Ásia, é um polissacarídeo neutro da família das mananas, muito abundante na natureza.

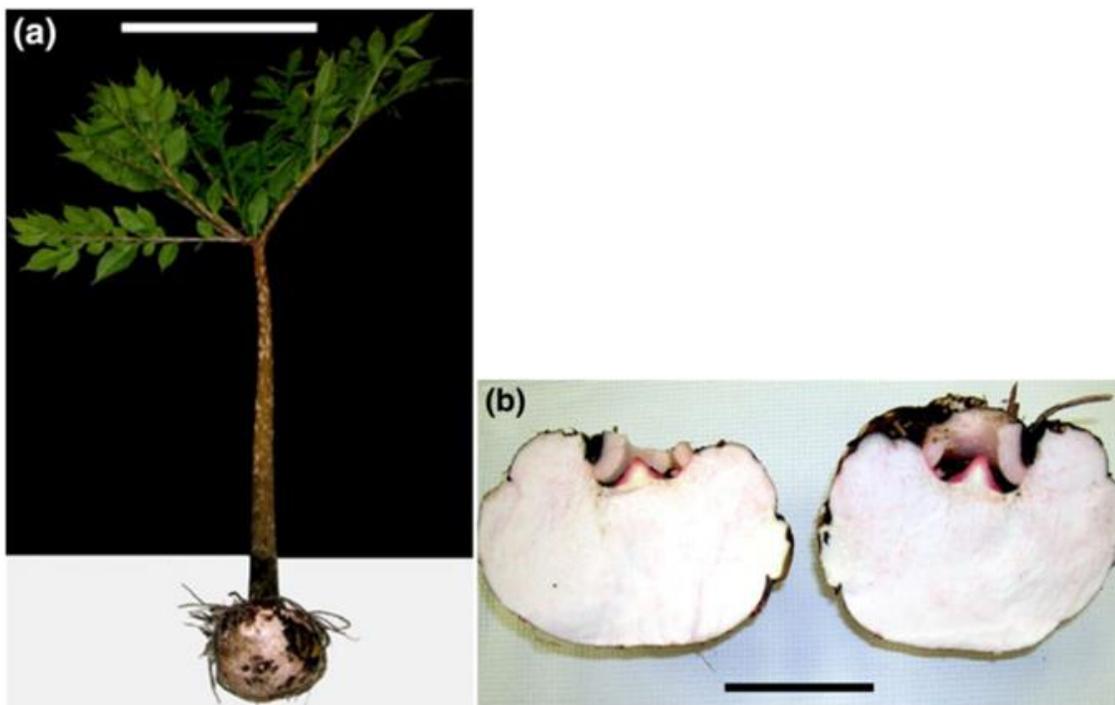


Figura 5 – Imagens (a) Planta *Amorphophallus Konjac C. Koch* com 17 semanas, barra representa 30 cm e (b) tubérculo da planta de mesma idade, barra representa 10 cm. Fonte: (Gille *et al.*, 2011).

A estrutura da glucomanana (Figura 6) independentemente da sua origem é composta por monômeros D-manose e D-glicose unidos por ligação $\beta(1\rightarrow4)$, porém a relação de quantidade destes monômeros, a massa molecular e o grau de acetilação podem variar de acordo com a origem do tubérculo, processo de extração, etc. Para a glucomanana de Konjac (KGM) a relação de manose/glicose é aproximadamente 1,6:1. A quantidade de grupos acetila ligados à cadeia da glucomanana também difere quanto a sua origem, podendo variar de 5 a 10%. É amplamente aceito que o grau de acetilação é responsável pela solubilidade da glucomanana em

água (Kato e Matsuda, 1969 *apud* Nishinari, 2000; Dave *et al.*, 1998; Nishinari, 2000; Zhang, Xie e Gan, 2005; Alonso-Sande *et al.*, 2009; Chen, Li e Li, 2011).

A extração da KGM consiste na lavagem dos tubérculos, seguido de fragmentação dos mesmos em fatias, que são secas e posteriormente moídas. Existem vários métodos de purificação da KGM, sendo que o etanol é o processo mais comum devido à praticidade e alta eficiência (Takigami, 2009). A glucomanana em pó é lavada com solução aquosa de etanol para remover impurezas. O etanol precipita a glucomanana, então o precipitado é separado e seco (Dave *et al.*, 1998; Takigami, 2009).

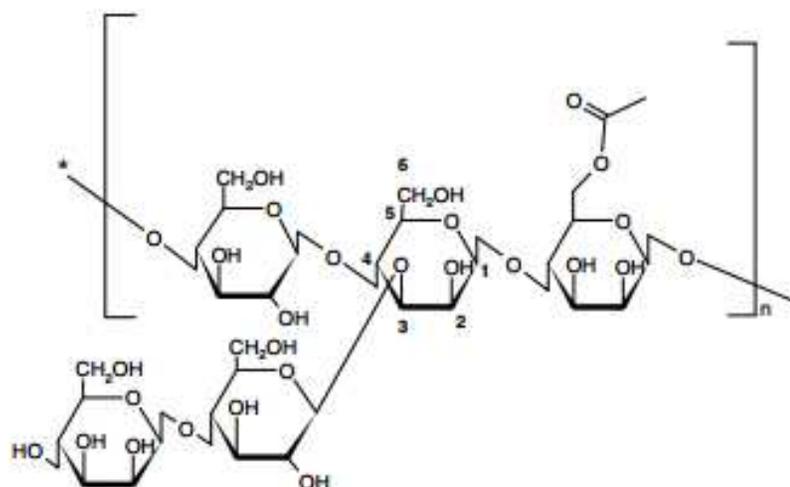


Figura 6 – Estrutura da KGM. Adaptado de Alonso-Sande *et al.* (2009).

Existe conflito na literatura quanto à existência de ramificações na estrutura molecular da KGM. Li e Xie (2006) demonstraram que a molécula é linear, porém Maeda, Shimahara e Sugiyama (1980) relataram a existência de ramificações sendo que Ogawa, Yui e Mizuno (1991) apresentaram uma estrutura de dupla hélice. Essas diferenças são provavelmente devido à forma de processamento, ou ainda lugar de cultivo da glucomanana.

A KGM em pó tem sido utilizada como alimento e como aditivos alimentares por mais de mil anos na China e no Japão (Zhang, Xie e Gan, 2005). Ela é utilizada para a produção do *konnyaku*, um gel muito popular que apresenta textura única, elevada resistência mecânica e elasticidade. A KGM é considerada um alimento não calórico, uma fibra dietética não digerível

que pode reduzir o risco de desenvolvimento de diabetes e doenças coronárias e também auxiliar na perda de peso (Nishinari, 2000; Koroskenyi e Mccarthy, 2001; Yang, Xiong e Zhang, 2002; Fan *et al.*, 2008).

A KGM vem sendo estudada nos campos de alimentos, engenharia química e farmacêutico, sendo muito utilizada no processamento de alimentos, cosméticos, superfícies de recobrimento, entre outras (Zhang, Xie e Gan, 2005). Mais recentemente a KGM tem sido estudada para a produção de biomateriais, por apresentar boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, sendo aplicada, por exemplo, na liberação controlada de drogas e na terapia celular (Wang e He, 2002; Ye *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Lu, Wang e Xiao, 2008).

3.4 Mecanismo de gelificação da KGM

O método mais comum utilizado na obtenção de géis de KGM é por aquecimento da solução de KGM contendo componentes alcalinos ou grandes quantidades de sais neutros (Xu *et al.*, 2007; Alvarez-Mancenido *et al.*, 2008; Alonso-Sande *et al.*, 2009). Além disso, outras formas de gelificação da KGM já foram estudadas, pelo uso de *crosslinkers*, como o bórax (borato de sódio) e o STMP (trissódio trimetafosfato), além da gelificação por adição de etanol (Gao, Guo e Nishinari, 2008; Wen *et al.*, 2008; Liu, Chen e Chen, 2010).

Apesar do uso de um agente alcalino, o gel obtido por esse mecanismo é considerado um gel físico, pois não se faz uso de reticuladores covalentes.

É bem conhecido que a KGM forma um gel termicamente irreversível, na presença de um coagulante alcalino, como Na_2CO_3 , NaOH , Ca(OH)_2 , KOH , entre outros (Yin *et al.*, 2008; Herranz *et al.*, 2012). A KGM perde seus grupos acetila após tratamento alcalino, e então ocorre a união entre as moléculas de KGM através de ligações de hidrogênio, pela qual as cadeias de KGM formam zonas de junção, levando à formação de gel (Maekaji, 1974). O efeito da adição de álcali serve para facilitar a desacetilação das cadeias KGM, uma vez que as carbonilas (C=O) presentes nos grupamentos acetila reagem com o álcali adicionado. Esta reação induz mudanças na estrutura molecular da KGM que facilitam a formação de pontes de hidrogênio, assim como interações hidrofóbicas entre as cadeias que compõem a estrutura em rede do gel (Xu *et al.*, 2007;

Alvarez-Mancenido *et al.*, 2008; Alonso-Sande *et al.*, 2009). A Figura 7 ilustra o mecanismo de formação do gel de KGM.

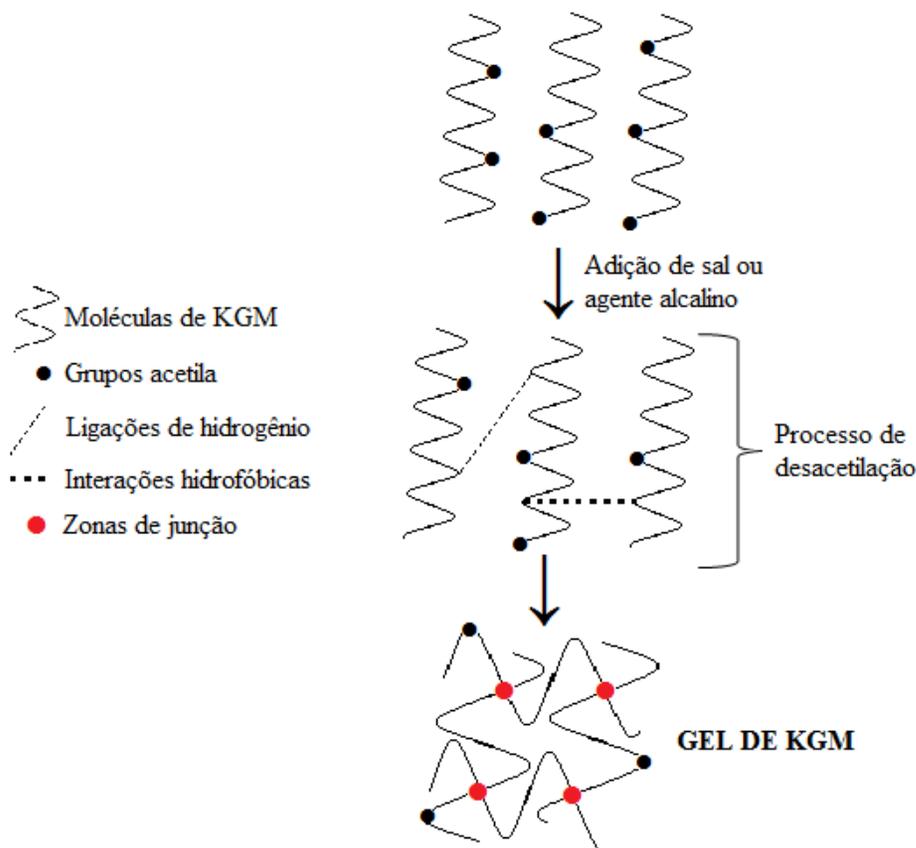


Figura 7 – Esquema do mecanismo de gelificação da glucomanana (Alonso-Sande *et al.*, 2009).

Porém, um recente estudo demonstrou que são três os possíveis efeitos da adição do álcali (Figura 8), além da desacetilação os autores acreditam que ocorrem também interações eletrostáticas e enfraquecimento nas pontes de hidrogênio da hidratação (Luo, He e Lin, 2013).

O efeito indutivo do álcali se dá devido à alta densidade de cargas negativas na molécula de KGM. O álcali é visto como um tipo de reagente nucleofílico. Ele induz a aproximação dos elétrons para o átomo de oxigênio do grupo hidroxila da cadeia, gerando um oxiânion. Então a força de repulsão eletrostática entre a cadeia ionizada da molécula e o íon hidróxido impede a expansão da molécula na solução. A terceira hipótese é explicada pelo fato do álcali enfraquecer

as pontes de hidrogênio da hidratação entre a molécula do polímero e a molécula da água, agindo como um eletrólito, resultando em expansão-supressão da molécula na solução (Luo, He e Lin, 2013).

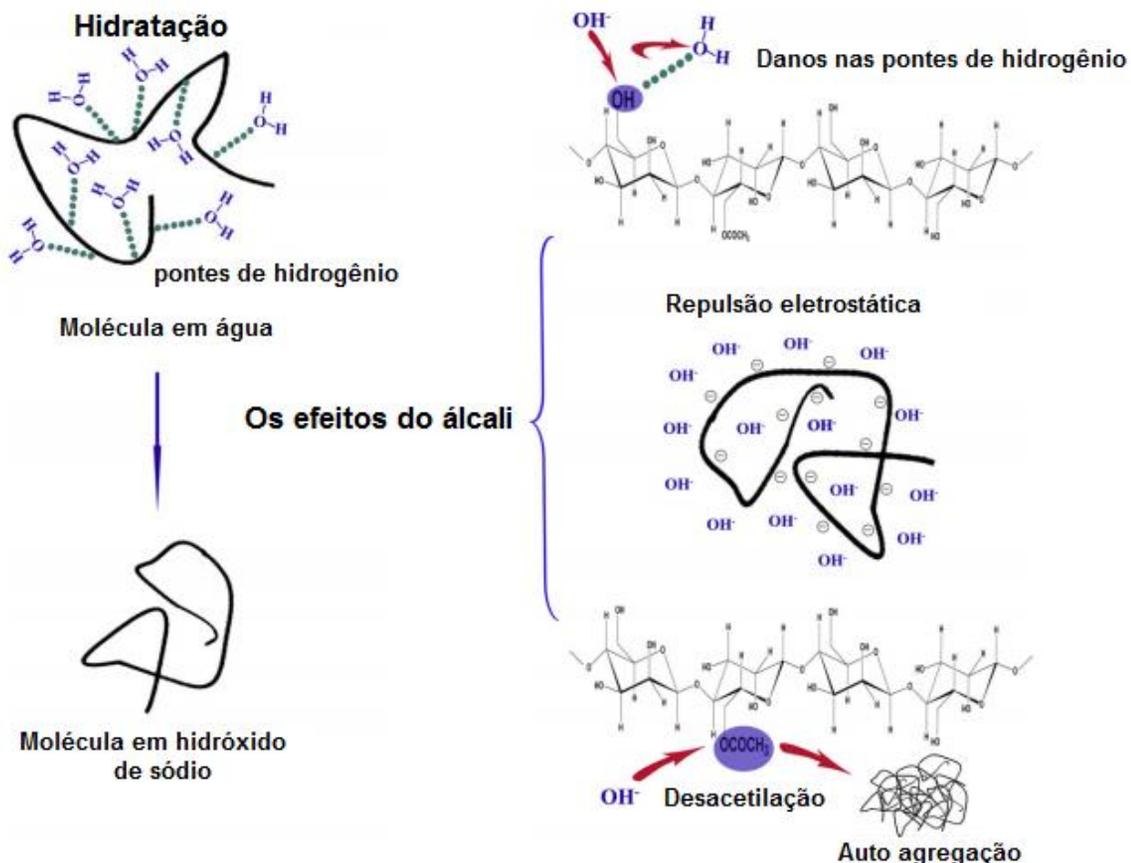


Figura 8 – Efeitos da adição de álcali na estrutura da KGM. Adaptado de Luo *et al.* (2013).

Parâmetros como temperatura, massa molecular e concentração de reagentes, influenciam a gelificação. De modo geral, o incremento desses parâmetros favorece o processo (Xu *et al.*, 2007; Alonso-Sande *et al.*, 2009). Com o aumento da concentração do polímero, o espaço livre entre as moléculas diminui e elas começam a se sobrepor, então as interações intermoleculares são reforçadas, surgindo ligações de hidrogênio e entrelaçamento entre as moléculas. Quanto à temperatura, esta pode favorecer a reação de desacetilação, além de proporcionar a movimentação das moléculas. Por mais que possa enfraquecer algumas ligações de hidrogênio, com o aumento da movimentação aumenta o entrelaçamento entre as cadeias, que é considerado uma interação mais forte (Luo, He e Lin, 2013).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização da KGM quanto a massa molecular

A caracterização da glucomanana quanto a sua massa molecular é importante visto que esta característica influencia diretamente sua propriedade gelificante e a força do gel formado por este polissacarídeo.

A determinação da massa molecular da glucomanana foi realizado em duplicata, utilizando a técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC). Esta análise foi realizada no Laboratório GPC/HPLC (FEQ/UNICAMP).

As amostras em solução foram preparadas dispersando 0,2 mg de glucomanana em pó para cada ml de água destilada, seguido por filtração em membranas de 0,45 μm (Phenex RC) e posteriormente injetada no cromatógrafo.

O sistema cromatográfico utilizado é composto pelos seguintes aparatos: bomba peristáltica (Waters, modelo 515), degaseificador (Viscotek, modelo VE7510), injetor (Rheodyne, modelo 7715i), sistema contendo um conjunto de três detectores (refratômetro, viscosímetro e espalhamento de luz), forno para colunas (Viscotek, modelo TDA302) e *software* Viscotek OmniSEC versão 4.6.2.

No sistema cromatográfico foram utilizadas duas colunas 7,8 x 300 mm em série (Ultrahydrogel Waters), uma com partículas de 6 μm e outra de 10 μm .

As condições experimentais empregadas foram: temperatura das colunas e dos detectores de 40 °C, solução de NaCl 0,1 mol/L como fase móvel (0,8 mL/min) e volume de amostra injetada nas colunas de 199 μL .

A determinação da massa molar da amostra de glucomanana de Konjac foi realizada por meio da calibração universal. Esta calibração consiste do seguinte procedimento: inicialmente foi injetado um padrão de óxido de polietileno para a calibração dos detectores e em seguida injetou-se a amostra para obter os valores de massa molar. Todos os cálculos (calibração e determinação de massa molar) foram realizados pelo *software* Viscotek OmniSEC versão 4.6.2.

4.2 Preparo dos hidrogéis de KGM

4.2.1 Composição das amostras

Devido ao fato deste estudo ser de caráter exploratório, tentou-se abranger uma ampla gama de condições para o preparo do hidrogel, a fim de obter um material com consistência e propriedades mecânicas interessantes para ser utilizado como *scaffold* para a engenharia tecidual.

Fez-se um planejamento experimental considerando as 3 variáveis: concentração de glucomanana, concentração de hidróxido de cálcio e temperatura, variando em 2 níveis, com ponto central (Tabela 1). Os valores de concentração utilizados foram determinados baseados no fato de que a glucomanana é muito viscosa e então concentrações acima da faixa estudada são de difícil solubilização. A escolha das temperaturas utilizadas foi baseada na teoria, boa parte das pesquisas utilizam valores altos de temperatura, mas alguns relatam o uso na faixa de 50 °C. Para o hidróxido de cálcio, as concentrações foram estabelecidas com base em testes preliminares, de maneira que visualmente não houvesse excesso de base no gel formado. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 2.

Tabela 1 – Tabela de níveis dos fatores estudados no processo de formação do hidrogel de glucomanana, considerando concentração de KGM, concentração da solução de hidróxido de cálcio e temperatura como fatores do estudo.

	-1	0	1
KGM (%)	1,5	2,0	2,5
Ca(OH) ₂ (mol/L)	0	0,2	0,4
Temperatura (°C)	35	65	95

A solução de KGM foi preparada adicionando lentamente a farinha de KGM (Konjac glucomannan powders, Konjac foods, China) em água. Para homogeneizar utilizou-se um misturador de pás por aproximadamente 30 segundos (Philips Walita, velocidade 3).

As amostras de aproximadamente 40 g de solução de KGM foram aquecidas à temperatura pré-determinada por 1 h e então adicionou-se em cada amostra 2 mL da solução de

hidróxido de cálcio (Synth, pureza mínima 95%) conforme concentração mostrada na Tabela 2. A concentração de hidróxido de cálcio expressa na tabela é referente a concentração da solução a ser adicionada na solução de glucomanana, sendo a concentração final de hidróxido de cálcio nos géis de 0,07 e 0,14% para os géis que foram adicionados solução de Ca(OH)_2 de 0,2 e 0,4 mol/L, respectivamente. Após a adição do hidróxido, misturou-se rapidamente com uma espátula. O produto foi mantido em condições ambientes (25 °C) por aproximadamente 40 h e posteriormente foi armazenado em geladeira (4 °C).

Tabela 2 – Composição dos hidrogéis de glucomanana preparados de acordo com o planejamento experimental.

Amostras	Concentração da solução de KGM (%)	Concentração da solução de Ca(OH)_2 (mol/L)	Temperatura (°C)
1	1,5	0	35
2	2,5	0	35
3	1,5	0,4	35
4	2,5	0,4	35
5	1,5	0	95
6	2,5	0	95
7	1,5	0,4	95
8	2,5	0,4	95
9	2,0	0,2	65
10	2,0	0,2	65
11	2,0	0,2	65

4.2.2 Medidas das propriedades reológicas

As amostras foram avaliadas quanto ao comportamento viscoelástico, sendo as variáveis resposta o módulo elástico e viscoso. As análises reológicas foram realizadas aproximadamente 40 h após o preparo das amostras. O equipamento utilizado foi um reômetro HAAKE RheoStress 6000 (Thermoscientific), com geometria de placas paralelas de titânio de 35 mm de diâmetro e 1 mm de *gap*. As análises foram feitas no regime viscoelástico linear a 25°C. A tensão utilizada foi 1 Pa e a frequência variou de 0,1 a 100 Hz.

4.2.3 Comportamento e a estabilidade térmica dos hidrogéis

4.2.3.1 Termogravimetria (TGA)

A análise termogravimétrica é utilizada para observar o comportamento e a estabilidade térmica dos hidrogéis, bem como os picos de degradação da glucomanana. As amostras foram liofilizadas previamente a análise. As análises foram realizadas no equipamento TA instruments, SDT 2960 Simultaneous DTA-TGA, do Laboratório de Caracterização de Materiais (LACAM/FEQ/UNICAMP), com faixa de temperatura de 25 a 600 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de nitrogênio.

4.2.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Analisa-se pela técnica DSC, o fluxo de calor relativo às transições químicas que ocorrem no material devido à temperatura. Essa análise foi realizada no equipamento DSC 2920, da marca TA instruments, do Laboratório de Caracterização de Materiais (LACAM/FEQ/UNICAMP) com faixa de temperatura de 25 a -60 °C e posterior aquecimento de -60 a 200 °C, a uma taxa de resfriamento/aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de nitrogênio.

4.2.3.3 Criomicroscopia óptica

Para a determinação das transições de fases do material pelo congelamento, utilizou-se o sistema de liofilização compacto com microscópio, modelo LYOSTAT 2, da marca Biopharma Technology Ltda do Laboratório de Física Industrial (FCF/USP). A taxa de resfriamento utilizada foi de 10 °C/min de 20 a -50 °C.

4.3 Cinética de gelificação

A cinética de gelificação foi avaliada acompanhando-se a cristalinidade do sistema por Difração de Raios X (DRX). A técnica é utilizada para verificar a cristalinidade do material. Para a realização das análises de raios X foi utilizado o equipamento X'PERT- MDP, Philips, do Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração (FEQ/UNICAMP), com radiação Cu-K α , com comprimento de onda de 1,54 Å, voltagem de 40 kV e corrente de 40 pA. A taxa de varredura utilizada foi de 0,033°/s, e 2 θ variando de 5 a 80°.

Para analisar o efeito do congelamento na cristalinidade dos hidrogéis, preparou-se uma amostra e após atingir a temperatura ambiente a mesma foi congelada por 8h em congelador convencional (aproximadamente -6 °C). Após descongelada a amostra foi analisada.

4.4 Criogelificação

Para averiguar se o hidrogel de glucomanana apresentava propriedades diferentes após congelamento foi feito um teste preliminar. Após 10 dias do preparo dos hidrogéis, uma amostra foi congelada em freezer convencional (aproximadamente -6 °C) por dois dias e posteriormente descongelada a temperatura ambiente na bancada. A amostra foi liofilizada e sua morfologia, avaliada em comparação a uma amostra que não passou pela etapa de congelamento. A resistência mecânica dos dois tipos de hidrogéis obtidos foi analisada por teste de compressão confinada. Os detalhes desta análise serão apresentados no tópico caracterização dos hidrogéis.

4.4.1 Efeito da taxa de congelamento

Para avaliar a influência da taxa de congelamento nos hidrogéis de KGM, estudou-se o congelamento em duas taxas distintas. Taxa alta (30 °C/min) foi obtida pelo congelamento da amostra com nitrogênio líquido em contato direto com a amostra, e taxa baixa (2,5 °C/min) congeladas em ultrafreezer com taxa de resfriamento controlada. O congelamento lento e as liofilizações das amostras foram realizadas no equipamento liofilizador da marca FTS Systems, modelo TDS-00209-A do Laboratório de Física Industrial I (FCF/USP). Antes da liofilização as amostras foram fraturadas, para posterior análise da morfologia.

4.4.2 Efeito da temperatura de congelamento

As temperaturas de congelamento (-8, -18 e -28 °C) foram estabelecidas baseadas nas análises térmicas DSC e criomicrografia.

As amostras foram congeladas no liofilizador da marca FTS Systems, modelo TDS-00209-A do Laboratório de Física Industrial I (FCF/USP), com taxa de resfriamento de 2,5 °C/min por 1, 2 e 3h. As amostras foram descongeladas em bancada e após aproximadamente 24h analisou-se o comportamento mecânico através de teste de compressão confinada, além da morfologia das amostras.

4.4.3 Caracterização dos hidrogéis

4.4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para analisar a morfologia dos hidrogéis, estes foram primeiramente congelados com nitrogênio líquido, com exceção dos hidrogéis descritos no tópico '4.3.1 Efeito da taxa de congelamento', fraturados e liofilizados por 24h.

As amostras foram recobertas com ouro utilizando um Sputter Coater POLARON (SC7620, VG Microtech, Inglaterra) e as micrografias foram registradas utilizando microscópio eletrônico de varredura (Leo 440i, LEO Electron Microscopy/Oxford, Inglaterra) do Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração (FEQ/UNICAMP).

4.4.3.2 Teste de compressão confinada

Para analisar a resistência mecânica dos hidrogéis utilizou-se o teste de penetração ou compressão confinada. Esse teste foi realizado no texturômetro TA.XT2 (Stable Micro Systems) no Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorecursos (LEPPBio/FEQ/UNICAMP). A célula de carga utilizada é de 50 kg.

As amostras foram preparadas em formato cilíndrico de aproximadamente 2 cm de diâmetro e 2 cm de altura. A sonda de meia polegada de diâmetro penetra 50% da altura do (1 cm), na velocidade de 0,2 mm/s.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da KGM quanto a massa molecular

A massa molar da glucomanana de konjac está relacionada com a sua fonte de origem e o seu processo de beneficiamento. A determinação da massa molar de glucomanana de konjac foi realizada por cromatografia de permeação em gel.

A massa molecular média da KGM é de $1,48 \times 10^6$ Da e o índice de polidispersidade médio é igual a 1,01. Os resultados de massa molecular para a amostra (duplicata) estão expostos no apêndice B.

A glucomanana apresenta alto valor de massa molecular e o resultado era esperado, pois em baixas concentrações a KGM apresenta alta viscosidade.

Comparando com os valores obtidos por Chua *et al.* (2012) que avaliou diferentes tipos de glucomanana de konjac, a matéria-prima utilizada neste estudo apresenta massa molar e polidispersidade comparável com a glucomanana de grau nutracêutico, produto nutricional com valor terapêutico, utilizado por estes autores, produto este que apresentava pureza acima de 99% de glucomanana.

O valor obtido para a polidispersidade indica que as moléculas de glucomanana apresentam em geral o mesmo tamanho, indicando que o processo de beneficiamento da matéria-prima deste estudo é adequado e não apresenta degradação das moléculas (Chua *et al.*, 2012).

5.2 Obtenção dos hidrogéis de KGM

Inicialmente fez-se uma análise visual para cada tipo de gel preparado (Tabela 3), considerando os fatores de temperatura, concentração de KGM e concentração de hidróxido de cálcio. As amostras estão numeradas de acordo com a Tabela 2.

As amostras preparadas a 35 °C, sem hidróxido de cálcio não gelificaram após 40 h de seu preparo, ficando com aspecto bem fluido. As demais amostras ainda eram fluidas, porém aquelas com maior concentração do polímero ou processadas em maior temperatura apresentaram-se mais consistentes.

No momento do preparo das soluções nota-se nitidamente que com o aumento da concentração do polímero a solução fica mais viscosa. Já para o caso de temperaturas elevadas (95 °C), as amostras que continham mais polímero ficaram ainda mais viscosas, o que dificultou um pouco mais a mistura do hidróxido de cálcio.

Tabela 3 – Aspecto visual das amostras de hidrogel de KGM logo após o preparo.

Amostras	Aspecto visual
1	Fluida
2	Fluida
3	Pouco viscosa
4	Muito viscosa
5	Pouco viscosa
6	Muito Viscosa
7	Viscosa
8	Muito viscosa
9, 10 e 11	Viscosas

No preparo das amostras, a homogeneização é difícil devido à alta viscosidade da solução. O material confina bolhas de ar, sendo necessário um processo de centrifugação para eliminá-las, porém os estudos foram realizados sem esta etapa.

5.2.2 Teste de reologia

A gelificação dos hidrogéis de KGM é muito lenta (não acontece de maneira instantânea), pois alterações foram observadas na estrutura das amostras analisadas no decorrer de uma semana, sendo as análises reológicas realizadas antes do processo de formação do hidrogel se encerrar.

As amostras que representam o ponto central (2% KGM, 0,2 mol/L Ca(OH)₂, 65 °C) e após sete dias do seu preparo, apresentaram melhores características físicas, ou seja, tornaram-se um gel mais sólido.

Os valores avaliados para as duas amostras (1 e 2) que ainda eram fluidas apresentaram grande oscilação, possivelmente porque as amostras não estavam no equilíbrio. Os valores dos módulos são totalmente dependentes da frequência, indicando que a interação intermolecular dessas amostras eram fracas.

O comportamento elástico e viscoso dos hidrogéis de KGM em função da frequência estão apresentados nas Figuras 9 e 10, respectivamente.

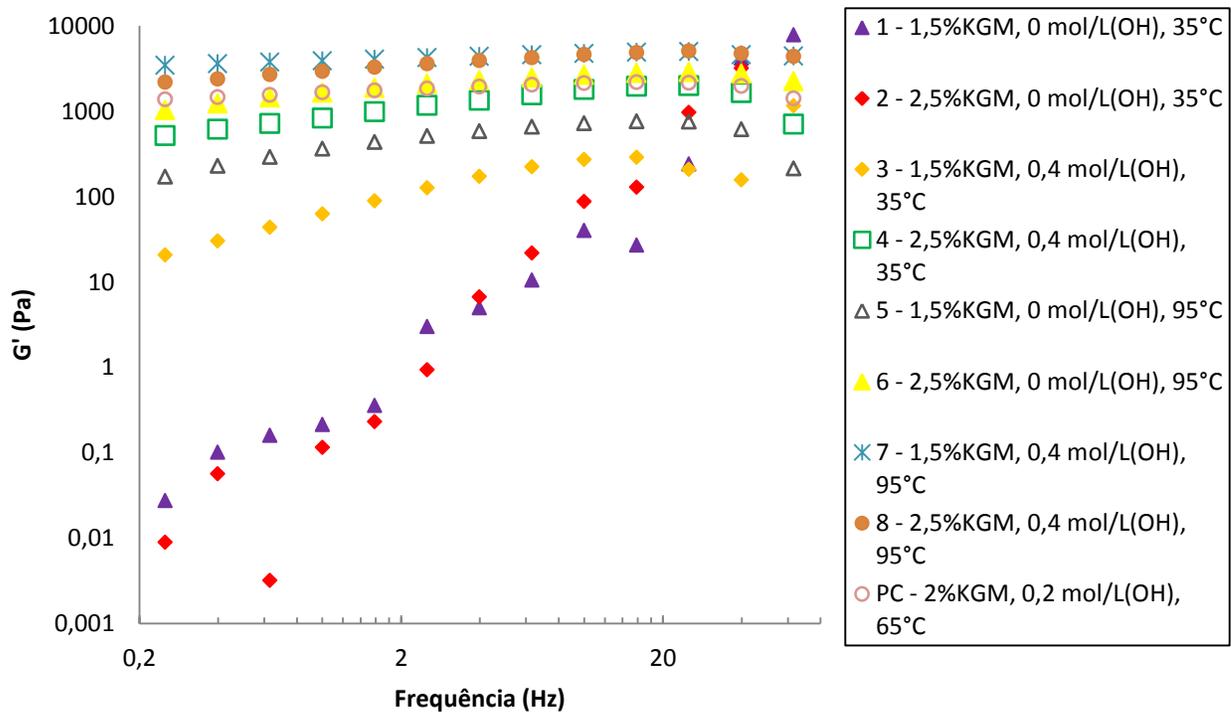


Figura 9 – Variação do módulo elástico dos hidrogéis de KGM em função da frequência.

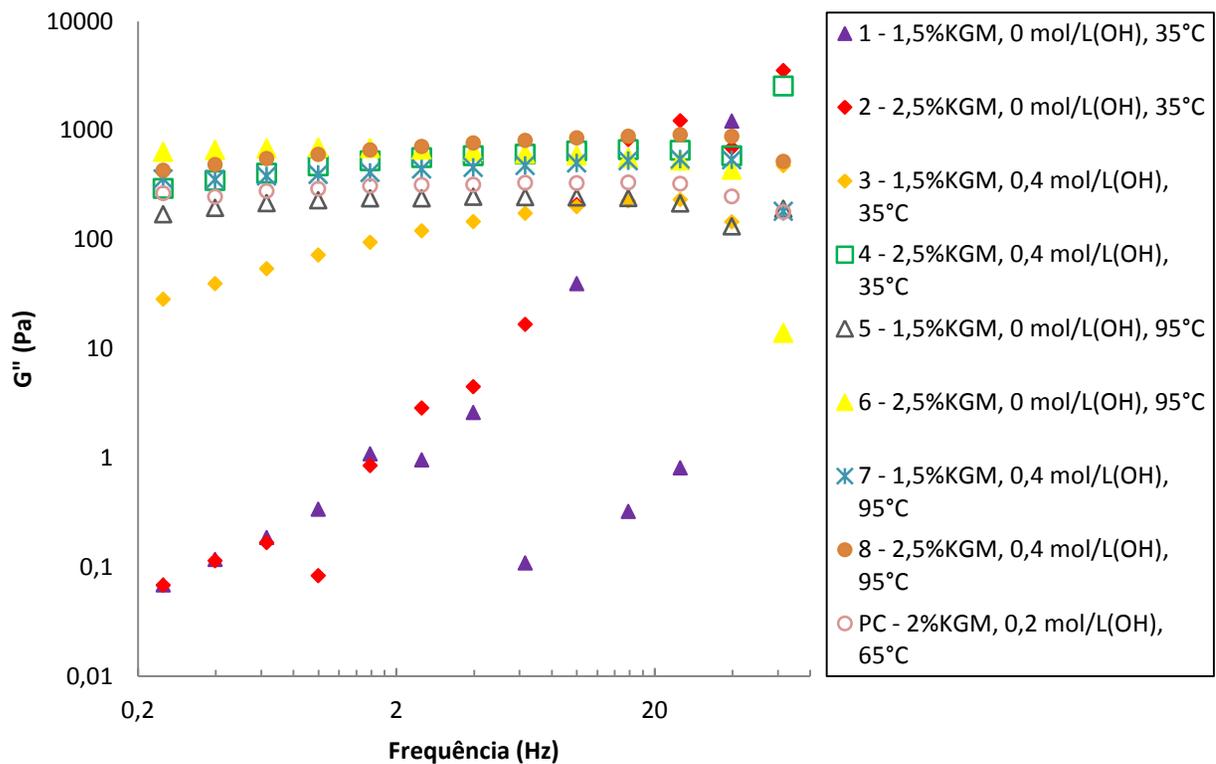


Figura 10 – Variação do módulo viscoso dos hidrogéis de KGM em função da frequência.

Géis de uma maneira geral apresentam tanto propriedades viscosas como elásticas, porém o módulo de armazenamento ou elástico (G') apresenta valores superiores aos do módulo de perda ou viscoso (G''). Sendo que quanto maior o módulo elástico mais próximo de um sólido é o material (Walter, 1998). Logo, pode-se afirmar que as amostras analisadas apresentaram comportamento de gel, pois $G' > G''$. Os valores dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') para a frequência de 1 Hz e 10 Hz estão apresentados na Tabela 4.

Os efeitos das variáveis estudadas foram avaliados com o auxílio do *software* Minitab[®] 15, sendo que os níveis dos fatores foram normalizados em -1 e +1. Para o módulo elástico a 1Hz e 10Hz, os efeitos estão apresentados nas Tabelas 5 e 6 e no apêndice A. As amostras foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância de 95%.

Tabela 4 – Valores dos módulos G' e G'' dos hidrogéis de glucomanana do planejamento experimental.

Ensaio	[KGM]	[Ca(OH) ₂]	T (°C)	G'		G''	
	(%)	(mol/L)		1 Hz	10 Hz	1 Hz	10 Hz
1	1,5	0	35	0,214	40,31	0,339	39,32
2	2,5	0	35	0,116	87,64	0,083	208,9
3	1,5	0,4	35	62,72	273,5	72,33	199,7
4	2,5	0,4	35	832,7	1799	472,7	647,1
5	1,5	0	95	363,1	721,4	229,1	242,4
6	2,5	0	95	1656	2664	696	588,2
7	1,5	0,4	95	3907	4737	395,2	501,3
8	2,5	0,4	95	2940	4606	602,4	849,8
9	2,0	0,2	65	1592	2076	281,2	327,9
10	2,0	0,2	65	1936	2402	303,6	328,4
11	2,0	0,2	65	1458	1916	287,8	329,7

Tabela 5 – Tabela de efeitos para o módulo elástico a 1 Hz.

Fatores	Efeitos	<i>p</i> -valor
[KGM]	273,9	0,257
[Ca(OH) ₂]	1430,7	0,015*
T	1992,6	0,008*
[KGM]×[Ca(OH) ₂]	-372,5	0,166
[KGM]×T	-111,0	0,590
[Ca(OH) ₂ ×T	983,2	0,030*
[KGM]×[Ca(OH) ₂ ×T	-757,5	0,049*

*Efeitos estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança.

Tabela 6 – Tabela de efeitos para o módulo elástico a 10 Hz.

Fatores	Efeitos	<i>p</i> -valor
[KGM]	846,1	0,040*
[Ca(OH) ₂]	1975,5	0,008*
T	2632,0	0,004*
[KGM]×[Ca(OH) ₂]	-148,9	0,485
[KGM]×T	59,7	0,766
[Ca(OH) ₂]×T	1003,3	0,029*
[KGM]×[Ca(OH) ₂]×T	-887,9	0,037*

*Efeitos estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança.

No módulo elástico a força de interação entre as moléculas fica mais evidente com o tratamento térmico seguido da presença do agente alcalino, nas faixas de valores estudados. A temperatura apresenta o maior valor de efeito, mostrando que a movimentação das cadeias promovidas pela temperatura aumenta o enovelamento entre as cadeias de maneira a fortalecer a estrutura em rede do gel. Mas a concentração do polímero também é um fator positivo na resistência a deformação. A temperatura apresenta grande importância ao analisar o módulo elástico principalmente para as amostras com menor quantidade de glucomanana, pois há um grande incremento no valor do módulo elástico com o aumento da temperatura. Como a concentração do polímero também é um fator positivo, quando utilizado em menor quantidade o fator temperatura se destaca, pois quando combinado esses dois fatores o incremento no módulo não é proporcional ao incremento dessas variáveis isoladas.

Gao e Nishinari (2004) também obtiveram acréscimo no módulo elástico com o acréscimo de temperatura. Porém, os autores relatam que acima de 50°C o módulo elástico tende a decrescer devido ao fenômeno de sinérese ocorrer durante o processo de gelificação ocasionado pela forte interação molecular provocada pela alta temperatura. A sinérese é o processo de separação/expulsão da água do gel, a forte interação entre as cadeias do polímero força a saída da água do sistema (Denardin, 2008).

A ordem dos fatores principais não mudam de uma frequência para outra, apenas o grau de significância. Para 1 Hz a temperatura e concentração do agente alcalino são estatisticamente

significativos ao nível de 95% de significância. Para 10Hz a concentração de polímero se torna significativa também. A combinação dos fatores temperatura e concentração da base apresentam efeitos positivos e significativos indicando que maiores módulos elásticos são obtidos desta combinação. Já a combinação dos três fatores apresenta valor de efeitos negativo, o que significa que a interação entre os três fatores simultaneamente não apresenta um acréscimo proporcional ao acréscimo de cada variável separadamente, nem dos efeitos cruzados das variáveis duas a duas.

O fato da concentração de polímero não influenciar significativamente no módulo elástico, pode ser explicado pelo fato de que a taxa de desacetilação decresce com o aumento da concentração de KGM durante a gelificação. Gao e Nishinari (2004) mostraram que o tempo crítico de gelificação da KGM aumenta bruscamente com o aumento da concentração de 0,87 para 1,8% em massa e que concentrações acima de 1,8% decrescem levemente.

O módulo viscoso apresentou maior dependência em relação a frequência, pois colocando os fatores em uma ordem de significância, os fatores variam de posição nas diferentes frequências analisadas. Para 1 Hz a temperatura é mais significativa que a concentração do polímero, seguido da concentração do agente alcalino, na faixa de valores estudados. Em 10 Hz a concentração do polímero é o fator mais significativo, seguido da concentração da base e então temperatura. Porém todos os fatores independentes ou cruzados são significativos para o módulo viscoso. Sendo valores negativos apenas os fatores que relacionam concentração da base com temperatura.

Para o módulo viscoso, os valores dos efeitos estão expostos nas tabelas 7 e 8 e no apêndice A.

No módulo viscoso a 10 Hz as amostras que apresentaram maior módulo foram as com maior concentração de polímero, o que é condizente, pois quanto maior a concentração de polímero maior é o contato entre uma cadeia e outra, comparando-se com substâncias de elevada massa molecular. Sendo que a presença de hidróxido e a temperatura são fatores que favorecem a interação intermolecular, conseqüentemente aumenta a resistência ao escoamento e à deformação.

Tabela 7 – Tabela de efeitos para o módulo viscoso (G'') a 1 Hz.

Fatores	Efeitos	<i>p</i> -valor
[KGM]	268,55	0,001*
[Ca(OH) ₂]	154,28	0,003*
T	344,31	0,001*
[KGM]×[Ca(OH) ₂]	35,23	0,049*
[KGM]×T	68,50	0,014*
[Ca(OH) ₂]×T	-118,03	0,005*
[KGM]×[Ca(OH) ₂]×T	-165,08	0,002*

*Efeitos estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança.

Tabela 8 – Tabela de efeitos para o módulo viscoso a 10 Hz.

Fatores	Efeitos	<i>p</i> -valor
[KGM]	327,82	0,000*
[Ca(OH) ₂]	279,77	0,000*
T	271,67	0,000*
[KGM]×[Ca(OH) ₂]	70,13	0,000*
[KGM]×T	19,33	0,001*
[Ca(OH) ₂]×T	-19,52	0,001*
[KGM]×[Ca(OH) ₂]×T	-68,78	0,000*

*Efeitos estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança.

Quanto maior o número de cadeias poliméricas na solução, mais próximas uma molécula se encontra da outra, facilitando assim as interações intermoleculares momentâneas, o que consequentemente resulta em maiores módulos elásticos (G') e viscosos (G'') precisando de mais energia para a deformação do material (Xu et al., 2007).

A concentração de hidróxido de cálcio é considerada um fator relevante na análise de ambos os módulos avaliados, pois as amostras com maior quantidade de hidróxido apresentaram módulos maiores. A diferença entre o valor dos módulos é menos significativa para o módulo viscoso chegando até se igualarem no caso das amostras 6 e 8, que com o aumento da frequência invertem a posição.

Gao e Nishinari (2004) testaram a gelificação de KGM com diferentes graus de acetilação (grupos acetila presentes na cadeia da glucomanana) e observaram que a gelificação de amostras com maior concentração do meio alcalino ocorria mais rapidamente. Quando a relação concentração do meio alcalino/grau de acetilação era maior que 0,1, os autores verificaram que, apesar de gelificar muito rápido, os valores do módulo elástico eram baixos. Indicando que para conseguir um gel elástico é necessário uma gelificação mais lenta.

Como o meio alcalino é responsável por reagir com os grupos acetila, induzindo mudanças na estrutura da KGM, facilitando a formação do gel, então uma maior concentração de hidróxido significa um maior grau de reticulação e conseqüentemente, maior módulo elástico (Xu *et al.*, 2007; Alvarez-Mancenido *et al.*, 2008; Alonso-Sande *et al.*, 2009).

Outra avaliação que se faz, é quanto à estabilidade dos géis formados, dado pela independência do módulo em relação a frequência, géis que apresentam $G' > G''$ com valores basicamente paralelos ao eixo da frequência são considerados géis fortes, ou seja, com interações intermoleculares fortes (Guedes, 2012). Nesse caso, pode-se dizer que, em relação ao comportamento viscoso, excluindo o gel com menor concentração de polímero ou sem hidróxido de cálcio e 35 °C de temperatura de processamento, todos os géis são basicamente independentes da frequência. Já para o módulo elástico, a maioria das composições apresentam um leve crescimento do módulo com o aumento da frequência. Nota-se que os dois maiores módulos elásticos só diferem na concentração do polímero e que o hidrogel com menor concentração de polímero apresentou-se um pouco mais estável, o que pode ser explicado pela necessidade de maior tempo de gelificação de amostras mais concentradas, também sugerido por (Maekaji, 1978 *apud* Gao e Nishinari, 2004).

O planejamento experimental aponta que as variáveis apresentam efeito positivo, mas nem sempre a combinação das mesmas resultam no mesmo efeito que elas desempenham isoladamente. Esse comportamento pode justificar o bom desempenho das amostras do ponto central, que apesar de não apresentarem os maiores valores do módulo elástico nem do viscoso, mantiveram-se estáveis em relação à variação da frequência, mostrando-se um gel forte.

Com a evolução da gelificação (dias), a estrutura do gel do ponto central foi a que atraiu a maior atenção devido à consistência do gel resultante (Figura 11), resistente ao manuseio. Foi o único hidrogel que se mostrou mais sólido, monolítico, podendo ser moldado de acordo com a necessidade, o que é muito interessante para a formação de *scaffolds*. Os demais géis que também apresentaram altos valores de módulos elástico e viscoso, não resultaram em uma estrutura firme, que pudesse ser aplicada como *scaffolds*, indicando que a análise reológica dessas amostras, não representam bem a propriedade destes materiais de formar monolitos.

Portanto, considera-se que o ponto central é a condição ótima do hidrogel, então a sequência desse estudo foi baseada apenas na composição desse gel.



Figura 11 – Fotos do hidrogel de glucomanana com 10 dias, obtido no ponto central (Concentração de KGM = 2 %; Concentração da solução $\text{Ca}(\text{OH})_2$ = 0,2 mol/L; Temperatura = 65 °C).

5.2.3 Termogravimetria (TGA)

As propriedades térmicas do hidrogel de glucomanana foram avaliadas por TGA e o termograma obtido está exposto na Figura 12.

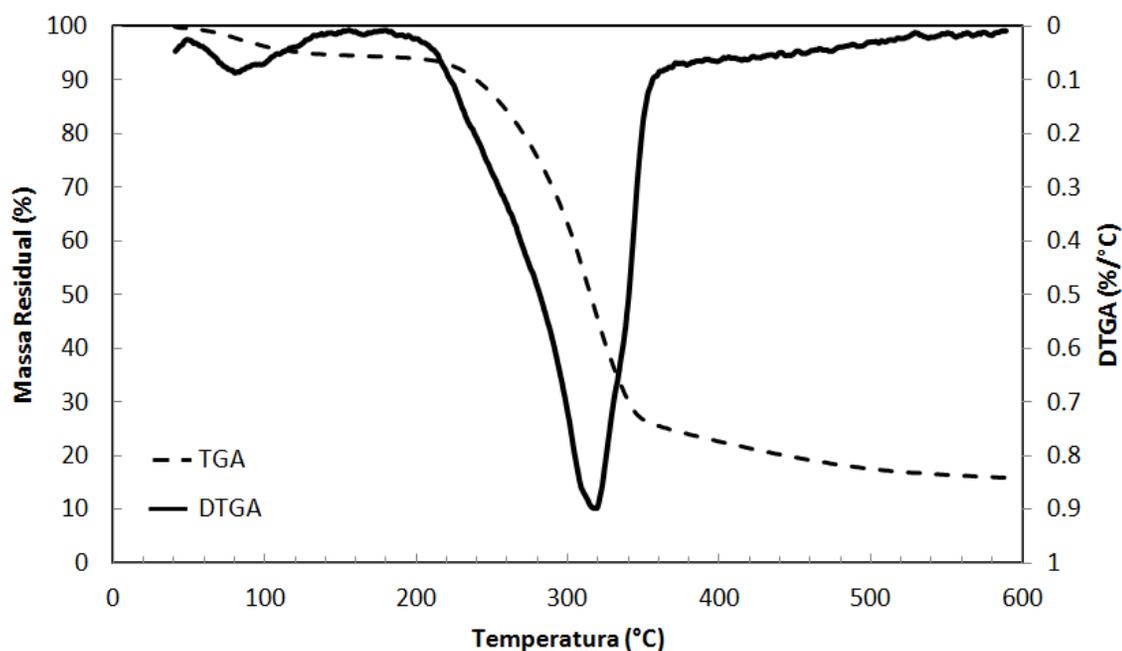


Figura 12 – Análise termogravimétrica (TGA) e curva da massa residual diferencial (DTGA) do hidrogel de KGM liofilizado.

A curva termogravimétrica obtida apresenta uma queda de aproximadamente 5% da massa inicial no início do aquecimento, com taxa de perda de massa mais alta em torno de 80 °C, possivelmente relacionado com a remoção de umidade. Porém, a degradação do material começa a partir de 210 °C, com taxa de perda de massa máxima em aproximadamente 320 °C. Nesta etapa de perda de massa acentuada, cerca de 60%, ocorre a degradação dos anéis sacarídeo e desintegração da cadeia da molécula (Yu *et al.*, 2007). Após 345 °C observa-se uma perda de massa lenta, sendo que ao final da análise a massa residual foi de aproximadamente 15%.

Os resultados obtidos para os hidrogéis de glucomanana são próximos dos resultados obtidos para a KGM pura estudada por Yu *et al.* (2007), sendo que a glucomanana pura mostrou-se um pouco mais estável, iniciando a degradação apenas em 250 °C.

5.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para determinar as transições térmicas tais como transição vítrea, temperatura de cristalização e fusão do hidrogel de glucomanana, fez-se uma análise de DSC (Figura 13).

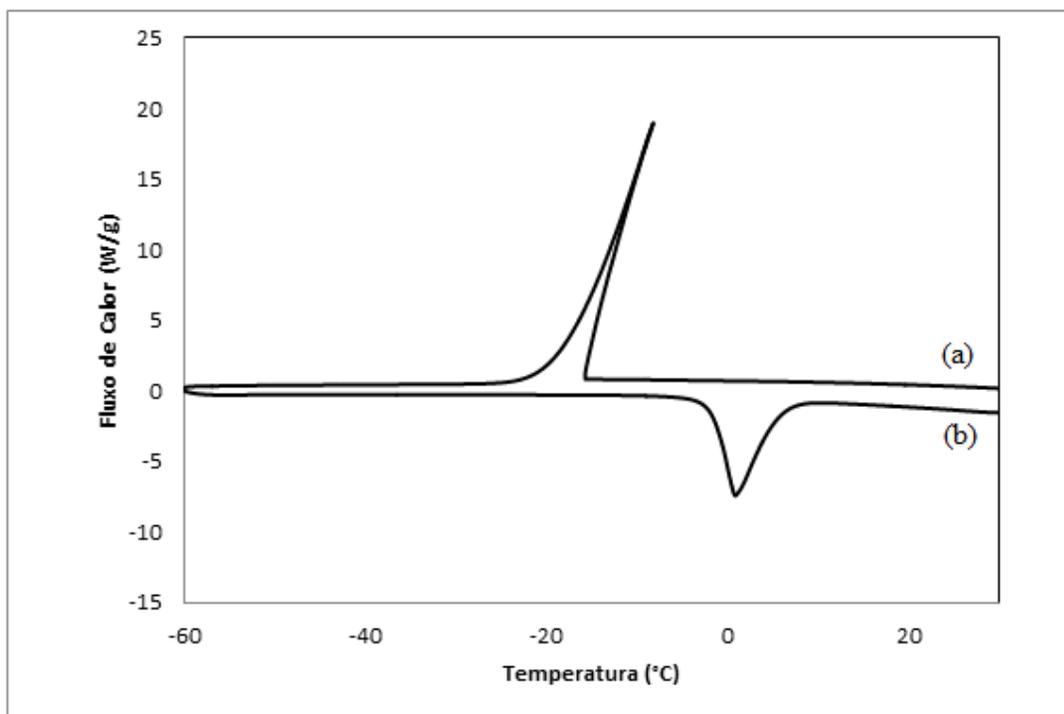


Figura 13 – Termograma obtido por DSC para o hidrogel de glucomanana no modo (a) resfriamento e b) aquecimento.

Durante o resfriamento pode-se observar um pico exotérmico referente à temperatura de cristalização do hidrogel, dado em aproximadamente $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$. Não foi possível detectar a transição vítrea do material. No aquecimento, o pico endotérmico em torno de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ é referente a fusão dos cristais de gelo.

O pico referente à cristalização está relacionado provavelmente com o congelamento da água. O formato do pico chama atenção, pois nota-se um aquecimento de aproximadamente $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante o congelamento, o que está relacionado à grande quantidade de calor liberado na mudança de fase. Esse resultado indica que a ligação da glucomanana com a água é forte, sendo necessária muita energia para a mudança de fase ocorrer, ou seja, para a água tornar-se gelo excluindo as cadeias do polímero, deixando de as solvatar.

A entalpia referente ao pico exotérmico obtido por DSC foi calculada com auxílio do *software* Universal V4.7A TA instruments, porém como há variação de temperatura calculou-se a

entalpia considerando toda a área relacionada com essa diferença de temperatura, o valor calculado aproximado foi obtido utilizando-se recursos gráficos, sendo que a entalpia total apresentou valor superior a entalpia da água pura. Este resultado era esperado, pois trata-se de água não pura, e provavelmente ligada à glucomanana, pois a mesma possui grupos fortemente hidratáveis, fazendo-se assim, necessária mais energia para que ocorra a mudança de fase. A Figura 14 apresenta as áreas utilizadas para o cálculo da entalpia.

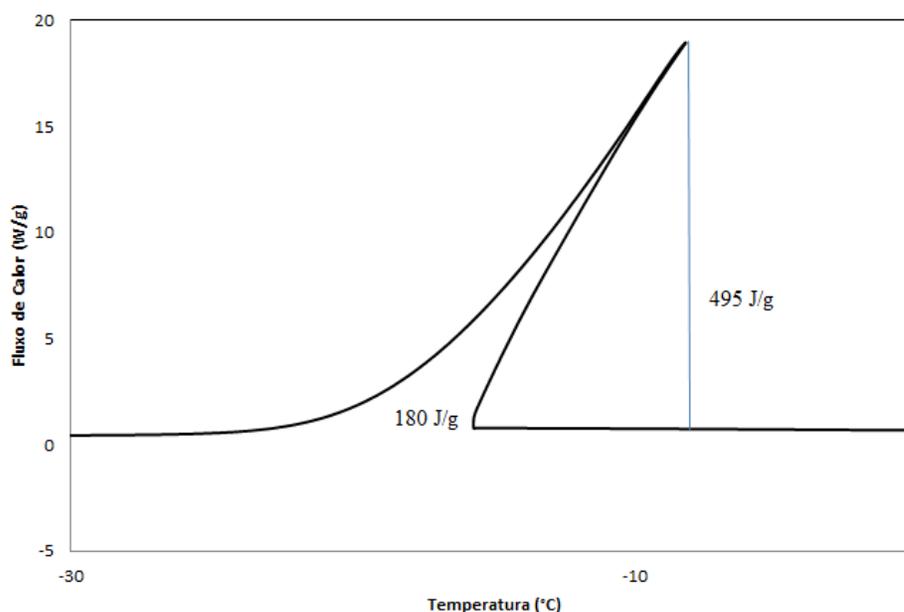


Figura 14 – Áreas utilizadas para o cálculo da entalpia utilizando o termograma obtido por DSC.

Prawitwong, Takigami e Phillips (2007) estudaram as transições térmicas da água na glucomanana, e encontraram que somente é possível determinar a T_g da glucomanana em amostras que contenham menos que 0,37 g de água por grama de KGM. O valor obtido por esses autores para a transição vítrea da glucomanana foi de $-40\text{ }^\circ\text{C}$.

A T_g de polímeros hidrofílicos diminui significativamente com a quantidade de água (Hatakeyama e Hatakeyama, 1998).

5.2.5 Criomicrografia óptica

Como não foi possível identificar temperatura de transição vítrea na análise de DSC, optou-se por utilizar criomicrografia óptica a fim de obter as transições térmicas do hidrogel de KGM. As micrografias estão expostas na Figura 15.

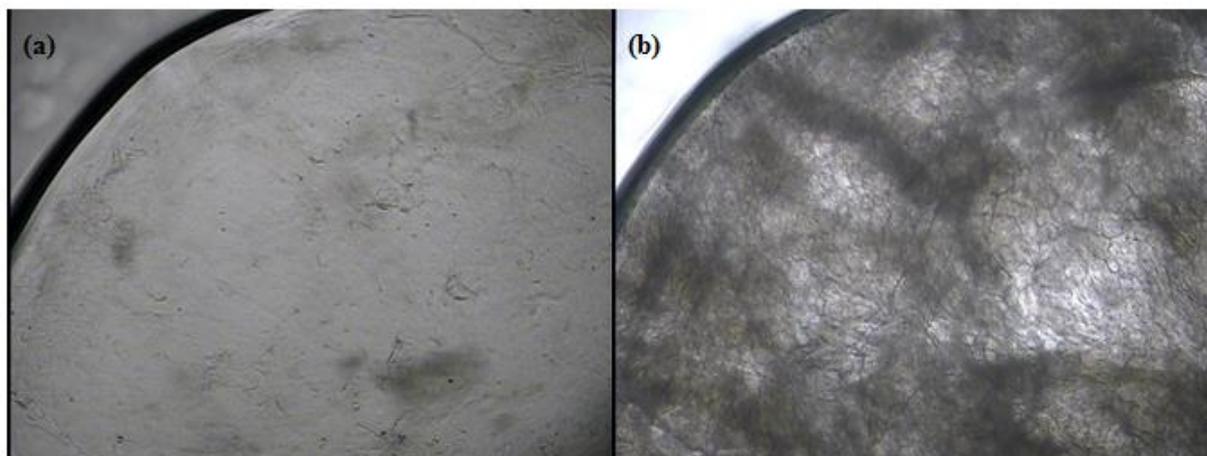


Figura 15 – Micrografias ópticas do hidrogel de glucomanana durante o congelamento nas temperaturas (a) $-15,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ e (b) $-17,3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Durante a criomicrografia óptica pode-se observar o momento de congelamento da amostra, que coincide com a transição observada no DSC por volta de $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$, comprovando que a temperatura de cristalização do material se dá por volta dessa temperatura. Na Figura 12 (b), as regiões escuras referem-se ao vapor d'água entre a lâmina e o material que agora descolou-se da mesma. Pode-se observar uma estrutura com a presença de uma espécie de grânulos, diferente da estrutura apresentada antes da transição. Porém, durante a liofilização, que é quando se consegue observar a transição vítrea, novamente não foi possível verificar essa informação.

5.3 Cinética de gelificação

Nos experimentos para identificação da melhor composição notou-se que o processo de gelificação dos hidrogéis de KGM é lento. Apesar do processo se iniciar logo após a adição do componente alcalino, as propriedades do gel modificam-se com o passar do tempo. Para estabelecer quanto tempo os hidrogéis necessitam para estabilizar fez-se um estudo cinético.

Em um primeiro momento tentou-se estudar a cinética através da medida de atividade de água, porém não houve alteração da medida com o passar dos dias sendo sempre 100%.

Outra tentativa foi obter informação cinética através de propriedade mecânica, por compressão confinada, esperava-se que com o passar dos dias a resistência mecânica do hidrogel à penetração da sonda fosse aumentando até estabilizar quando a cinética acabasse. Porém, devido à necessidade de usar amostras diferentes, pois o gel no início é muito mole e este é um teste destrutivo, o comportamento não seguiu uma tendência, variando aleatoriamente com o passar dos dias.

Então optou-se por analisar a cristalinidade do material com o passar dos dias utilizando a técnica de difração de raios X. Os difratogramas para o mesmo hidrogel ao longo do tempo estão apresentados na Figura 16.

Durante a análise de DRX há um leve aquecimento da amostra devido à irradiação, o que causou uma pequena perda de água em cada vez que o material foi submetido à análise.

Os difratogramas em geral, são gráficos que indicam a posição angular e a intensidade dos feixes difratados pelo material, em relação as suas regiões cristalinas. Como o hidrogel é um material amorfo, tem-se basicamente um espalhamento de raios-X.

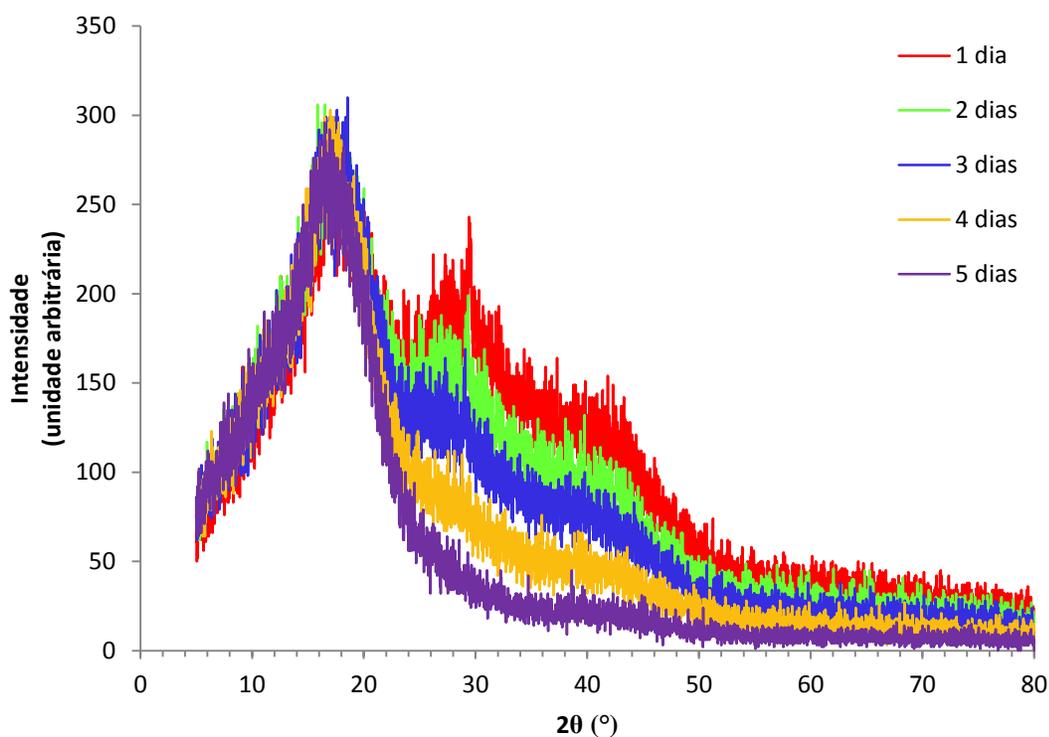


Figura 16 – Difratoformas de raios X para o hidrogel de KGM.

Os hidrogéis de glucomanana são materiais amorfos, com halo de cristalinidade em torno de 18 graus. Alguns autores relatam a existência de halos menos intensos na região de 11 e 36 graus aproximadamente. Devido ao ruído e sobreposição apresentado nos dados na região de 11 graus não é possível definir a existência de um halo nesta região, mas nota-se um pequeno deslocamento da curva, que pode estar relacionado com a existência desse pequeno halo relatado por Ogawa, Yui e Mizuno (1991). Na Figura 16 podemos observar halos menores em 27 e 40 graus, aproximadamente, porém estes variam de intensidade com o passar dos dias, sendo que no quinto dia o halo em 27 graus não é mais identificado e em 40 graus é muito sutil.

Baseado na Lei de Bragg (Equação 1), pode-se afirmar que a região de menores distâncias interplanares fica menos intensa com o passar dos dias, mesmo com a desidratação da amostra. Os difratogramas sugerem que a gelificação da glucomanana aumenta as distâncias interplanares da estrutura final da rede polimérica.

$$\lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta \quad (1)$$

onde: λ é o comprimento de onda do feixe de raios X, 1,54 Å

d é a distância interplanar (Å)

A continuação da análise não foi possível devido à excessiva perda de água do material, além do aparecimento de fungos. Mas pode-se concluir que houve mudança na estrutura do gel ao longo do tempo, chegando-se próximo ao equilíbrio após cinco dias. Sabe-se com certeza que, no mínimo durante os cinco dias que sucedem a preparação do material não se obtém um material estável.

Para a amostra que foi congelada (Figura 17) pode-se observar que o hidrogel também se apresenta na forma amorfa, porém o difratograma é coerente com o difratograma da análise do quarto dia de gelificação do hidrogel não criogelificado, sugerindo que o congelamento acelera o processo de gelificação, podendo ser utilizado para estabilizar mais rapidamente o material.

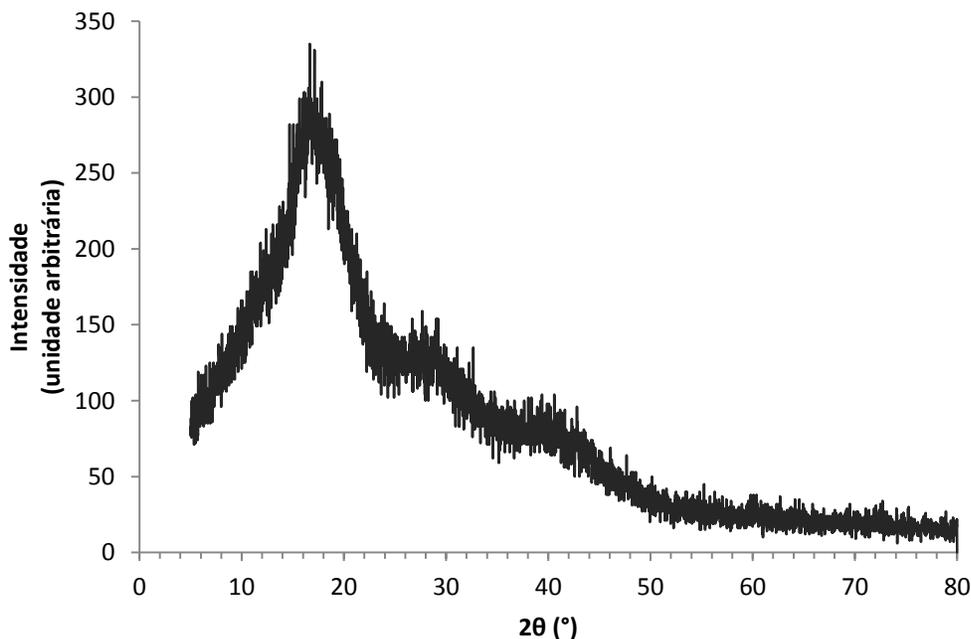


Figura 17 – Difratograma de raios X para o hidrogel de KGM após congelamento.

5.4 Criogelificação

Após 10 dias o hidrogel obtido utilizando as condições do ponto central foi congelado a aproximadamente $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 dias para uma análise prévia da influência do congelamento na morfologia do hidrogel. As micrografias desta análise estão expostas na Figura 18.

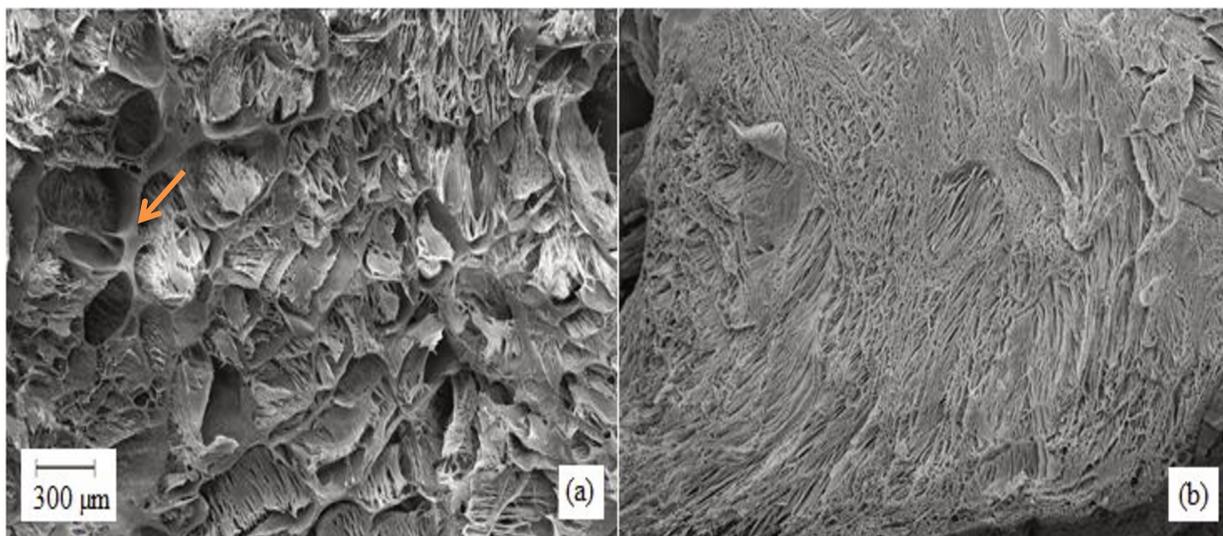


Figura 18 – Micrografias obtidas por MEV para fratura do (a) hidrogel criogelificado e (b) hidrogel mantido em geladeira.

O principal objetivo da criogelificação é o aumento no tamanho de poros e o reforço nas propriedades mecânicas do hidrogel, isso se deve à formação dos cristais de gelo, que aprisionam as cadeias do polímero, fazendo com que surjam regiões mais densas do mesmo. O mecanismo se deve pela exclusão das cadeias do polímero pela água que, agora deixa de solvatar e forma um cristal de gelo. Na Figura 18 (a), pode-se observar essas zonas de aglomeração de polímero, sugerindo que a criogelificação dos hidrogéis de glucomanana pode ser uma ferramenta interessante para obtenção de materiais mais resistentes e porosos. A região de alta concentração de polímeros nas paredes dos poros assegura a elasticidade do material (Plieva, Galaev e Mattiasson, 2007).

Nota-se uma grande diferença na morfologia dos hidrogéis, pois a estrutura e tamanho dos poros são bem diferentes. A estrutura que é observada no interior dos poros da amostra

congelada e basicamente em toda a amostra que não passou pela etapa de criogelificação, pode ser atribuída ao congelamento rápido por nitrogênio líquido, necessário para o processo de liofilização. O congelamento rápido é responsável pela formação de uma estrutura alinhada, como será abordado no tópico “5.4.1 Efeito da taxa de congelamento”.

Hidrogéis congelados após o décimo dia de gelificação foram avaliados por teste de compressão confinada em relação à hidrogéis não congelados com o mesmo tempo de gelificação. Os resultados da força de penetração da amostra em 50% de deformação estão expostos da Figura 19.

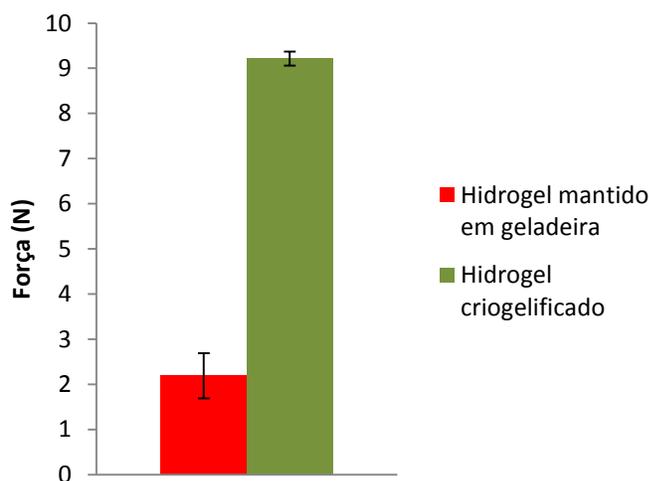


Figura 19 – Resultados do teste de compressão confinada para avaliação do efeito do congelamento.

O congelamento proporcionou uma melhora expressiva na resistência a compressão, a força de penetração da sonda aumentou mais de 4 vezes em relação ao hidrogel não congelado. Essa melhora condiz com o observado ao manusear as amostras. Após o congelamento o material apresenta-se mais resistente ao manuseio.

5.4.1 Efeito da taxa de congelamento

A taxa de congelamento é um parâmetro muito importante na formação de poros em hidrogéis, pois ela induz o crescimento dos cristais de gelo. Quando o congelamento ocorre de maneira rápida, com taxa alta, os poros tendem a crescer no sentido do gradiente de temperatura,

resultando em estrutura de poros lamelar. Já quando a taxa de congelamento é baixa, os cristais de gelo crescem de maneira isotrópica, lentamente, o que resulta em poros maiores, interconectados (Hsieh *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2009).

Na Figura 20, podemos observar que para os hidrogéis de glucomanana a estrutura de poros difere bastante variando a taxa de congelamento, apresentando poros maiores e isotrópicos para taxa pequena ($2,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$), e poros alinhados para taxa grande ($30^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

Essa imagem de microscopia eletrônica de varredura foi obtida da fratura das amostras, porém para o congelamento lento, a fratura foi feita após a liofilização, devido à dificuldade de fraturar a amostra congelada, portanto as partes esbranquiçadas desta imagem referem-se ao rasgo da estrutura, e devem ser desconsideradas.

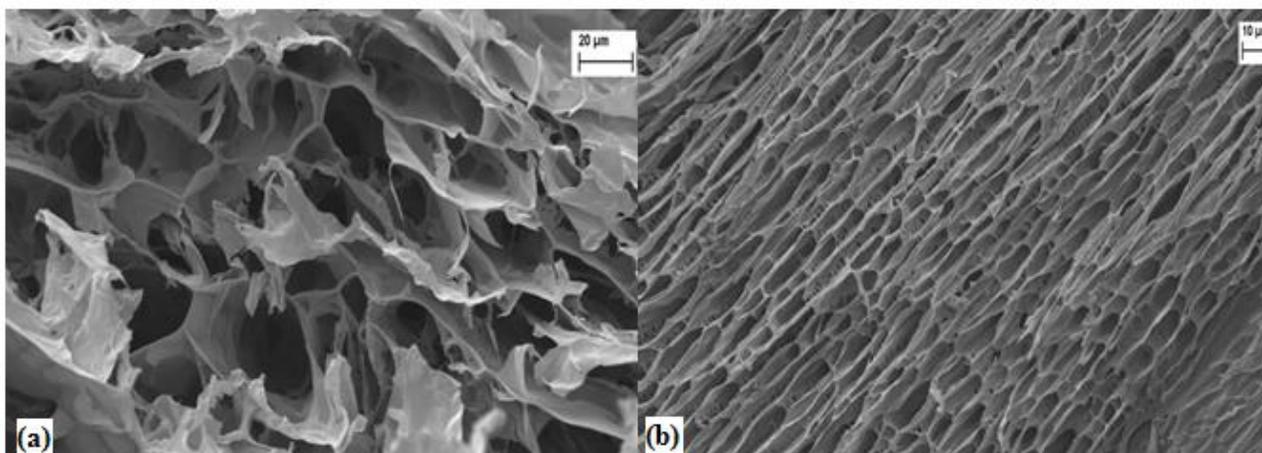


Figura 20 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da fratura de hidrogéis de glucomanana resultantes de a) congelamento lento ($2,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e b) congelamento rápido ($30^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

O material congelado rapidamente apresenta uma estrutura alinhada, que está de acordo com o observado na literatura (Yuan *et al.*, 2009). Logo, conclui-se que os hidrogéis que foram congelados com nitrogênio para a liofilização, apresentam este tipo de estrutura devido ao congelamento rápido.

O material congelado lentamente apresenta poros maiores e, apesar da não uniformidade no tamanho dos poros, a estrutura desse material é mais interessante para a aplicação em *scaffolds*, visto que há mais espaço para a permeação e proliferação celular.

O resultado obtido segue o previsto na literatura, já que demonstrou o mesmo comportamento de outros polissacarídeos já estudados (Yuan *et al.*, 2009). Para aplicação como biomateriais deseja-se materiais com poros grandes e interconectados, logo deve-se utilizar taxa pequena para o congelamento desses hidrogéis de KGM.

5.4.2 Efeito da temperatura de congelamento

Os hidrogéis de glucomanana foram congelados a diferentes temperaturas, em um freezer com taxa de congelamento controlada. As temperaturas estudadas (-8, -18 e -28 °C) foram estabelecidas baseado na análise de DSC e criomicrografia, que apesar de não ser possível detectar a temperatura de transição de vítrea, nos mostra onde ocorre a cristalização, então estabeleceram-se valores de temperaturas antes e depois desse ponto, além de uma temperatura próxima à temperatura de cristalização. As morfologias dos géis obtidos após o congelamento nessas temperaturas estão expostas na Figura 21.

Durante o congelamento notou-se que apesar do equipamento controlar a taxa de resfriamento, o hidrogel não acompanhou exatamente essa taxa devido ao seu volume, considerado grande para uma resposta imediata da variação da temperatura. Para as condições onde o gradiente de temperatura era maior, a taxa de congelamento foi mais alta em relação aos gradientes menores.

Novamente nota-se a formação de poros maiores para a taxa de congelamento mais baixa, dada pela temperatura de -8 °C, assim como a presença da estrutura alinhada no interior dos poros, atribuída ao congelamento que antecede a liofilização.

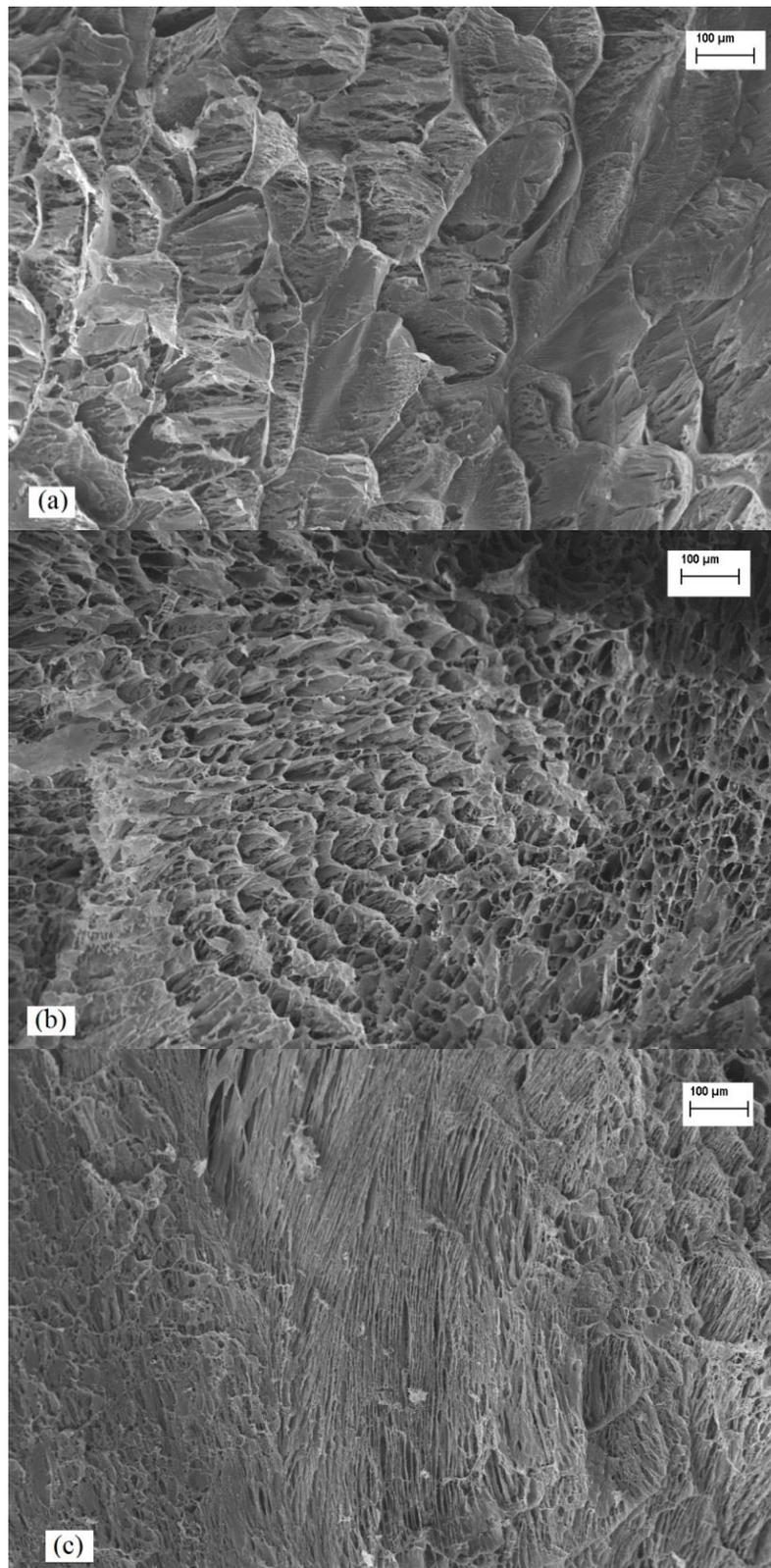


Figura 21 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da fratura de hidrogéis resultantes de congelamento nas temperaturas a) $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, b) $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e c) $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os hidrogéis congelados em diferentes temperaturas foram submetidos à avaliação das propriedades mecânicas pelo teste de compressão confinada, o comportamento típico das curvas tensão-deformação dos hidrogéis de KGM está exposto na Figura 22.

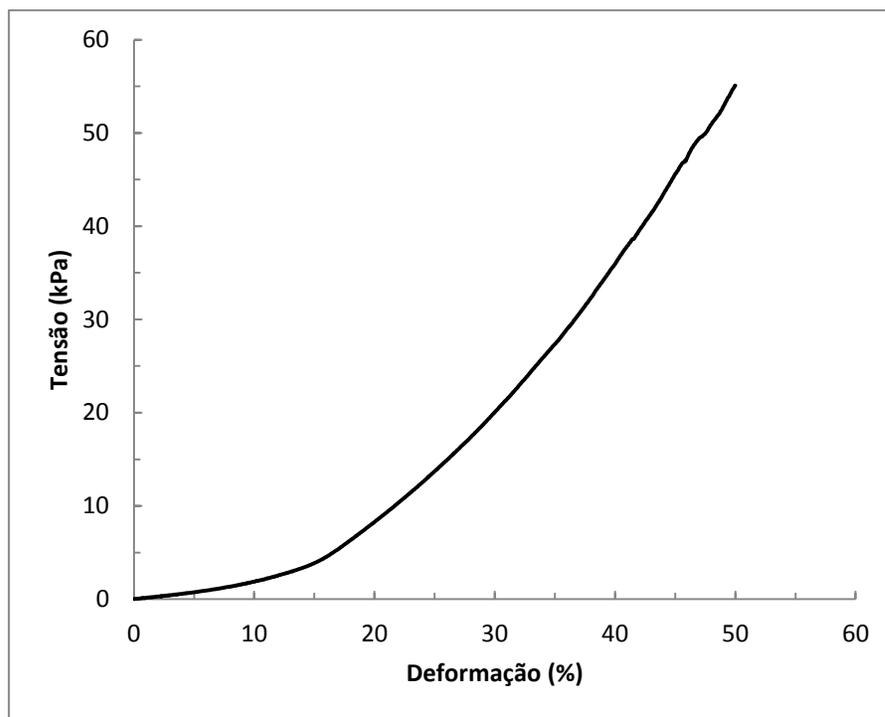


Figura 22 – Curva típica de tensão-deformação dos hidrogéis de KGM.

A compressão da amostra até 15% de deformação não apresentou resposta elástica. Nesta etapa o hidrogel passa por uma espécie de compactação, com perda de água, logo a deformação não é reversível.

Entre 15 e 40% de deformação a resposta à compressão é linear, região utilizada para a obtenção do módulo de compressão (Figura 23). Após 40% de deformação alguns hidrogéis se romperam. Considera-se que não há influência do fundo do molde nos resultados, pois a compressão foi realizada até uma altura de 1 cm sendo que a altura total do molde são 2 cm.

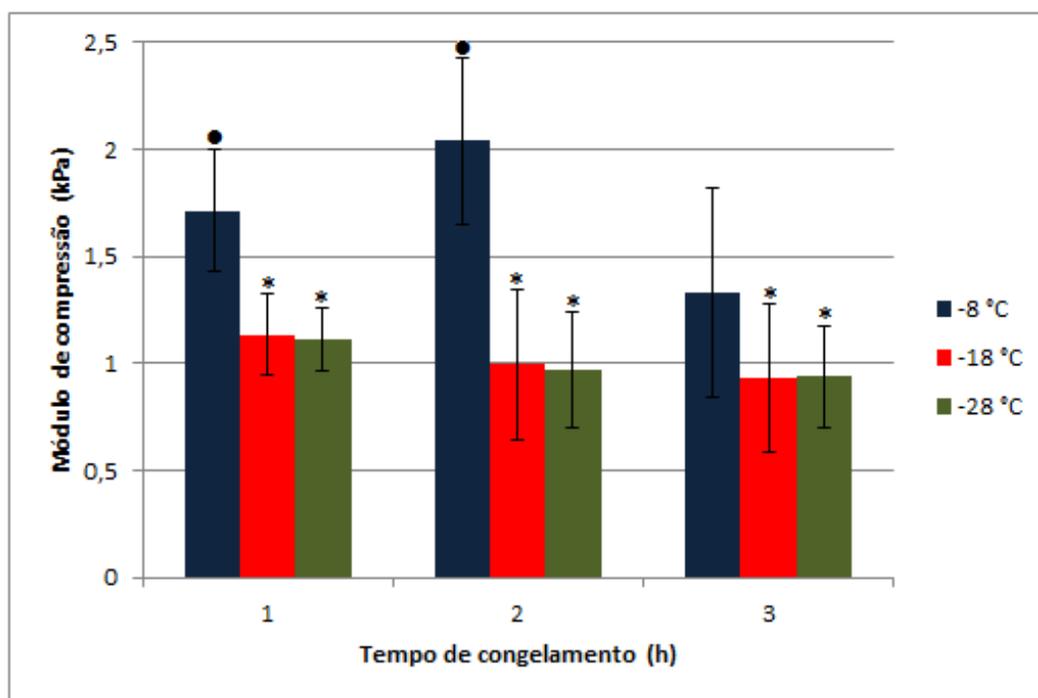


Figura 23 – Resultado do teste de compressão confinada dos hidrogéis de KGM mantidos por diferentes tempos nas temperaturas de congelamento avaliadas.

*, ● indica que não há diferença estatisticamente significativa entre as colunas de mesmo símbolo ($p < 0,05$).

O congelamento realizado a -8 °C foi o único a apresentar valores diferentes estatisticamente, apresentando sempre maior módulo de compressão do que os demais hidrogéis congelados a -18 °C e -28 °C . Mostrando que o congelamento em temperaturas mais altas resulta em estruturas mais resistentes, principalmente pelo fato do congelamento ocorrer mais lentamente.

O tempo de congelamento não influenciou na medida dos módulos de compressão, apenas para o caso do congelamento a -28 °C por 3h, porém ainda não se sabe o que proporcionou essa variação. O que podemos notar é que o erro para essa amostragem é um pouco maior em relação às demais.

Yuan et al. (2009) também avaliou a influência de diferentes temperaturas no congelamento de polissacarídeos e em suas amostras não houve diferença significativa nos

ensaios de tensão entre as temperaturas avaliadas, porém as amostras congeladas lentamente apresentaram resultados superiores aquelas congeladas rapidamente. O que nos leva a concluir que o aumento na resistência mecânica dos hidrogéis de glucomanana a $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ é principalmente devido a taxa de congelamento ter sido menor do que os demais.

Os hidrogéis de glucomanana preparados nesta dissertação apresentaram módulos de compressão superiores aos hidrogéis de colágeno (aproximadamente 0,093 kPa) testados sobre mesma condição reportados na literatura (De Moraes *et al.*, 2012). Mesmo após o reforço desses hidrogéis de colágeno com fibras de fibroína de seda, um material com reconhecida resistência mecânica, a glucomanana mostrou-se mais resistente à compressão, evidenciando sua potencial aplicação na engenharia tecidual.

6 DISCUSSÃO FINAL

Nesse trabalho foi apresentada uma metodologia para o preparo de hidrogéis de glucomanana assim como a avaliação da influência do congelamento e da maneira como ocorre o congelamento na morfologia e resistência mecânica dos hidrogéis.

O nosso laboratório, Laboratório de Engenharia e Química de Produtos (LEQUIP) da Unicamp, é especialista em polímeros de origem natural, sendo que vários trabalhos tanto no desenvolvimento de tecnologias de obtenção e preparo, quanto aplicação desses materiais para uso médico já foram estudados (Beppu, Polakiewicz e Nogueira; Vasconcellos *et al.*, 2010; Vasconcellos, Goulart e Beppu, 2011; De Moraes *et al.*, 2012; De Paiva *et al.*, 2012; De Moraes e Beppu, 2013). A glucomanana é um material que foi recentemente introduzido no grupo de pesquisa, sendo esta dissertação o primeiro trabalho utilizando a glucomanana pura.

A glucomanana é conhecida por apresentar elasticidade e resistência mecânica, normalmente utilizada para a produção de filmes e blendas com outros polímeros naturais. Essas propriedades são muito interessantes para a engenharia tecidual. Porém, a produção de materiais a base de glucomanana para esse fim ainda é muito incipiente na literatura.

No preparo dos hidrogéis, foram avaliadas as variáveis temperatura, concentração de agente alcalino e do polímero. Essas variáveis são extremamente importantes para a formação da estrutura em rede do gel. A adição de álcali é indispensável para a formação do hidrogel de glucomanana. A temperatura mostrou ser a variável mais influente no módulo elástico e a concentração do polímero no módulo viscoso. Sendo que os valores intermediários das variáveis testadas, resultaram em um monolito com propriedades muito interessantes. Foi obtido um gel, resistente ao manuseio e com propriedades elásticas quando utilizada temperatura de 65 °C, concentração de KGM de 2% e hidróxido de cálcio de 0,2 mol/L. Este hidrogel foi escolhido como o ponto ótimo e a continuidade do trabalho foi realizada com este material.

O processo de transformação de solução em uma rede tridimensional (gelificação) é lento, mas o material formado é maleável, resistente, borrachoso. Indicando que a glucomanana é um material com potencial para aplicação na engenharia tecidual.

A porosidade e a resistência mecânica de materiais são propriedades extremamente importantes quando aplicados em engenharia tecidual. Utilizando congelamento foi possível obter hidrogéis com poros maiores e com maior resistência mecânica, o que indica que o congelamento é um método interessante para o preparo de hidrogéis para esta aplicação. Além de ser um processo fácil e relativamente barato comparado com outras técnicas utilizadas para controlar a porosidade dos materiais, como por exemplo, a liofilização.

O congelamento foi analisado quanto à taxa de congelamento, temperaturas e tempos diferentes. O tempo e temperaturas de congelamento não apresentaram interferência significativa nas propriedades dos hidrogéis, diferentemente da taxa de congelamento, fator que apresentou influência tanto na formação de poros quanto na resistência mecânica. Os resultados obtidos para os testes de congelamento foram coerentes com a literatura.

O congelamento lento resultou em uma condição de poros mais condizente com a necessária para aplicação como *scaffolds* na engenharia tecidual. Apesar de não uniforme, o tamanho dos poros formados nessa condição são maiores, distribuídos por todo o material de maneira isotrópica.

A glucomanana não gelifica utilizando apenas a criogelificação, é necessário adição de agente alcalino e altas temperaturas para a formação do gel. O congelamento funciona neste caso, como uma etapa adicional ou tratamento secundário para a obtenção de um material mais resistente e com poros maiores.

7 CONCLUSÃO

O hidrogel na condição de 2% em massa de glucomanana, concentração de 0,2 mol/L da solução de hidróxido de cálcio e temperatura de preparo de 65°C apresentou características mais próximas das necessárias para aplicação como *scaffolds* em engenharia tecidual.

Dentre os fatores avaliados no preparo dos hidrogéis, a temperatura mostrou-se o fator principal quando avaliado a resposta elástica desses materiais. Para o módulo viscoso, todos os efeitos se mostraram estatisticamente significativos ao nível de 95% de significância, mas a concentração se destaca, especialmente em frequências maiores.

A criogelificação é um método interessante e aplicável aos hidrogéis de glucomanana, para melhorar características do material, como porosidade e resistência mecânica.

A taxa de congelamento é o fator que apresenta as principais alterações na morfologia e resistência mecânica dos hidrogéis, sendo o congelamento lento o mais indicado para a produção de *scaffolds* para a engenharia tecidual a partir de hidrogéis de glucomanana.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo da criogelificação por congelamento da solução e posterior imersão em não solvente.
- Testar ciclos de congelamento.
- Avaliar os hidrogéis de glucomanana quanto à atividade biológica (contato com células).
- Aplicar a técnica de criogelificação à outros polímeros naturais.
- Avaliar a possibilidade de aplicação dos hidrogéis de glucomanana como *scaffolds* para regeneração de cartilagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, S. et al. Classes of Materials Used in Medicine. In: RATNER, B. D.;HOFFMAN, A. S., *et al* (Ed.). **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. 2. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004.

ACHILLI, M.; LAGUEUX, J.; MANTOVANI, D. On the Effects of UV-C and pH on the Mechanical Behavior, Molecular Conformation and Cell Viability of Collagen-Based Scaffold for Vascular Tissue Engineering. **Macromolecular Bioscience**, v. 10, n. 3, p. 307-316, 2010.

ALMDAL, K. et al. Towards a phenomenological definition of the term 'gel'. **Polymer Gels and Networks**, v. 1, n. 1, p. 5-17, 1993.

ALONSO-SANDE, M. et al. Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 2, p. 453-462, 2009.

ALVAREZ-MANCENIDO, F. et al. Konjac glucomannan and konjac glucomannan/xanthan gum mixtures as excipients for controlled drug delivery systems. Diffusion of small drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, n. 1-2, p. 11-18, 2008.

BEPPU, M. M.; POLAKIEWICZ, B.; NOGUEIRA, G. M. **Obtaining method for porous membranes of silk fibroin, involves removing parts of sericin in silk and dissolution of fibroin in ternary solution of calcium chloride-ethanol hydrate and agitation of fibroin solution**: Unicamp, 2008.

BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOD, E. N. **Fenômenos do Transporte**. 2. Editora Wiley, 2005.

BOCCAFOSCHI, F. et al. Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7410-7417, 2005

BODMEIER, R.; PAERATAKUL, O. Plasticizer uptake by aqueous colloidal polymer dispersions used for the coating of solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 152, n. 1, p. 17-26, 1997.

CHEN, J.; LI, J.; LI, B. Identification of molecular driving forces involved in the gelation of konjac glucomannan: Effect of degree of deacetylation on hydrophobic association. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 865-871, 2011.

CHEN, J. et al. Structural characterization and properties of starch/konjac glucomannan blend films. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 4, p. 946-952, 2008.

CHEUNG, H.-Y. et al. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. **Composites Part B-Engineering**, v. 38, n. 3, p. 291-300, 2007.

CHUA, M. et al. Methodologies for the extraction and analysis of konjac glucomannan from corms of *Amorphophallus konjac* K. Koch. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 2202-2210, 2012.

DAVE, V. et al. Liquid crystalline, rheological and thermal properties of konjac glucomannan. **Polymer**, v. 39, n. 5, p. 1139-1148, 1998.

DE MORAES, M. A.; BEPPU, M. M. Biocomposite membranes of sodium alginate and silk fibroin fibers for biomedical applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 130, n. 5, p. 3451-3457, 2013.

DE MORAES, M. A. et al. Mechanical and Biological Performances of New Scaffolds Made of Collagen Hydrogels and Fibroin Microfibers for Vascular Tissue Engineering. **Macromolecular Bioscience**, v. 12, n. 9, p. 1253-1264, 2012.

DE PAIVA, R. G. et al. Multilayer biopolymer membranes containing copper for antibacterial applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 126, p. E17-E24, 2012.

DENARDIN, C. C. **Influência do teor de amilose e beneficiamento do arroz na resposta biológica de ratos**. 162 (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

DEVINE, D. M.; HIGGINBOTHAM, C. L. The synthesis of a physically crosslinked NVP based hydrogel. **Polymer**, v. 44, n. 26, p. 7851-7860, 2003.

FAN, J. et al. In vitro evaluations of konjac glucomannan and xanthan gum mixture as the sustained release material of matrix tablet. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 2, p. 241-247, 2008.

GAO, S.; GUO, J.; NISHINARI, K. Thermoreversible konjac glucomannan gel crosslinked by borax. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 2, p. 315-325, 2008.

GAO, S. J.; NISHINARI, K. Effect of degree of acetylation on gelation of konjac glucomannan. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 1, p. 175-185, 2004.

GEORGE, J. H. S. **Engineering of fibrous scaffolds for use in regenerative medicine**. 200 (PhD). Department of Materials, Imperial College London, 2009.

GIL, E. S.; SPONTAK, R. J.; HUDSON, S. M. Effect of β -sheet crystals on the thermal and rheological behavior of protein-based hydrogels derived from gelatin and silk fibroin. **Macromolecular Bioscience**, v. 5, n. 8, p. 702-709, 2005.

GILLE, S. et al. Deep sequencing of voodoo lily (*Amorphophallus konjac*): an approach to identify relevant genes involved in the synthesis of the hemicellulose glucomannan. **Planta**, v. 234, n. 3, p. 515-526, 2011.

HARKIN, D. G. et al. Silk fibroin in ocular tissue reconstruction. **Biomaterials**, v. 32, n. 10, p. 2445-2458, 2011.

HATAKEYAMA, H.; HATAKEYAMA, T. Interaction between water and hydrophilic polymers. **Thermochimica Acta**, v. 308, n. 1-2, p. 3-22, 1998.

HERRANZ, B. et al. Effect of alkalis on konjac glucomannan gels for use as potential gelling agents in restructured seafood products. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 145-153, 2012.

HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering (vol 4, pg 518, 2005). **Nature Materials**, v. 5, n. 7, p. 590-590, 2006.

HSIEH, C.-Y. et al. Analysis of freeze-gelation and cross-linking processes for preparing porous chitosan scaffolds. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 1, p. 124-132, 2007.

KICKHOFEN, B. et al. Chemical and physical-properties of a hydrogel wound dressing. **Biomaterials**, v. 7, n. 1, p. 67-72, 1986.

KIM, I. L.; MAUCK, R. L.; BURDICK, J. A. Hydrogel design for cartilage tissue engineering: A case study with hyaluronic acid. **Biomaterials**, v. 32, n. 34, p. 8771-8782, 2011.

KITA, M. et al. Evaluation of polyvinyl-alcohol hydrogel as a soft contact-lens material. **Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 228, n. 6, p. 533-537, 1990.

KOPECEK, J.; YANG, J. Review - Hydrogels as smart biomaterials. **Polymer International**, v. 56, n. 9, p. 1078-1098, 2007.

KOROSKENYI, B.; MCCARTHY, S. P. Synthesis of acetylated konjac glucomannan and effect of degree of acetylation on water absorbency. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 3, p. 824-826, 2001.

LANGER, R.; TIRRELL, D. A. Designing materials for biology and medicine. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 487-492, 2004.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. TISSUE ENGINEERING. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-926, 1993.

LI, B.; XIE, B. J. Single molecular chain geometry of konjac glucomannan as a high quality dietary fiber in East Asia. **Food Research International**, v. 39, n. 2, p. 127-132, 2006.

LIU, C.; CHEN, Y.; CHEN, J. Synthesis and characteristics of pH-sensitive semi-interpenetrating polymer network hydrogels based on konjac glucomannan and poly(aspartic acid) for in vitro drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 3, p. 500-506, 2010.

LIU, C. Z.; CZERNUSZKA, J. T. Development of biodegradable scaffolds for tissue engineering: a perspective on emerging technology. **Materials Science and Technology**, v. 23, n. 4, p. 379-391, 2007.

- LU, J.; WANG, X.; XIAO, C. Preparation and characterization of konjac glucomannan/poly(diallyldimethylammonium chloride) antibacterial blend films. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 3, p. 427-437, 2008.
- LUO, X.; HE, P.; LIN, X. The mechanism of sodium hydroxide solution promoting the gelation of Konjac glucomannan (KGM). **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 92-99, 2013.
- MA, R.-Y.; XIONG, D.-S. Synthesis and properties of physically crosslinked poly (vinyl alcohol) hydrogels. **Journal of China University of Mining & Technology**, v. 18, n. 2, p. 4, 2008.
- MAEDA, M.; SHIMAHARA, H.; SUGIYAMA, N. Studies of mannan and related-compounds .5. Detailed examination of the branched structure of konjac glucomannan. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 245-252, 1980.
- MAEDA, Y. et al. Immunolocalization of glucomannans in the cell wall of differentiating tracheids in *Chamaecyparis obtusa*. **Protoplasma**, v. 213, n. 3-4, p. 148-156, 2000.
- MAEKAJI, K. Mechanism of gelation of konjac mannan. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 315-321, 1974.
- MANDAL, B. B.; KAPOOR, S.; KUNDU, S. C. Silk fibroin/polyacrylamide Semi-interpenetrating network hydrogels for controlled drug release. **Biomaterials**, v. 30, n. 14, p. 2826-2836, 2009.
- MASKARINEC, S. A.; TIRRELL, D. A. Protein engineering approaches to biomaterials design. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 422-426, 2005.
- MENDIETA-TABOADA, O.; DE CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. D. A. Análise Dinâmico-Mecânica: Aplicações em filmes comestíveis. **Química Nova**. 31: 384-393 p. 2008.
- MUZZARELLI, R. et al. Biological-activity of chitosan - ultrastructural-study. **Biomaterials**, v. 9, n. 3, p. 247-252, 1988.
- NISHINARI, K. Konjac Glucomannan. In: DOXASTAKIS, G. e KIOSSEOGLOU, V. (Ed.). **Novel Macromolecules in Food Systems**: Elsevier, v.41, p.309-330, 2000.

OGAWA, K.; YUI, T.; MIZUNO, T. X-Ray Diffraction Study of Glucomannans and Their Acetates. **Agriculture Biology Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 7, 1991.

PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. **Journal of Separation Science**. 30: 1657-1671, 2007.

PLIEVA, F. M. et al. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 129-137, 7/25/ 2004.

PRAWITWONG, P.; TAKIGAMI, S.; PHILLIPS, G. O. Phase transition behaviour of sorbed water in Konjac mannan. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 8, p. 1368-1373, 2007.

RABKIN, E.; SCHOEN, F. J. Cardiovascular tissue engineering. **Cardiovascular Pathology**, v. 11, n. 6, p. 305-317, 2002.

RAO, M. A. **Rheology of fluid and semisolid foods: Principles and applications**. New York: Aspen Publishers, 1999.

RATNER, B. D. et al. Biomaterial science: A Multidisciplinary Endeavor. In: RATNER, B. D.;HOFFMAN, A. S., *et al* (Ed.). **Biomaterial science: An Introduction to Materials in Medicine**. 2. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004.

ROOS, Y. H. **Phase Transitions in Foods**. San Diego: Academic Press, 1995.

ROSIK, J. M. et al. Radiation formation of hydrogels for biomedical application. In: (Ed.). **Radiation synthesis and modification of polymers for biomedical applications**. Vienna, Austria: Internacional Atomic Energy Agency (IEAE), 2002.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo: Editora Artliber, 2006.

SHAW, D. J. **Introdução a química dos colóides e de superfícies**. São Paulo: Editora da USP, 1975.

STAUFFER, S. R.; PEPPAS, N. A. Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing. **Polymer**, v. 33, n. 18, p. 3932-3936, 1992.

TAKIGAMI, S. Konjac Mannan. In: PHILLIPS, G. O. e WILLIAMS, P. A. (Ed.). **Handbook of hydrocolloids**. 2nd. Cambridge, UK: Woodhead publishing limited, 2009.

TATTINI JUNIOR, V. **Efeito da liofilização sobre a estrutura e mudanças de fase da albumina bovina modificada por reação com metoxi-poli(etileno)glicol**. 67 (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, 2004.

VASCONCELLOS, F. C.; GOULART, G. A. S.; BEPPU, M. M. Production and characterization of chitosan microparticles containing papain for controlled release applications. **Powder Technology**, v. 205, n. 1-3, p. 65-70, 2011.

VASCONCELLOS, F. C. et al. Bioactive Polyelectrolyte Multilayers: Hyaluronic Acid Mediated B Lymphocyte Adhesion. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 9, p. 2407-2414, 2010.

VELEMA, J.; KAPLAN, D. Biopolymer-based biomaterials as scaffolds for tissue engineering. **Tissue Engineering I: Scaffold Systems for Tissue Engineering**, v. 102, p. 187-238, 2006.

VENKATESAN, J. et al. Preparation and characterization of chitosan-carbon nanotube scaffolds for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 2, p. 393-402, 2012.

WALTER, R. H. **Polysaccharide Dispersions: Chemistry and Technology in Food**. San Diego: Academic Press, 1998.

WANG, C.-C. et al. A highly organized three-dimensional alginate scaffold for cartilage tissue engineering prepared by microfluidic technology. **Biomaterials**, v. 32, n. 29, p. 7118-7126, 2011.

WANG, K.; HE, Z. M. Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, n. 1-2, p. 117-126, 2002.

WANG, X. et al. Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation. **Biomaterials**, v. 29, n. 8, p. 1054-1064, 2008.

WEN, X. et al. Preparation of konjac glucomannan hydrogels as DNA-controlled release matrix. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 3, p. 256-263, 2008.

WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists**. 2nd edition. St. Paul, Minnesota, USA.: American Association of Cereal Chemists, 1999.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in biomaterial**. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials: **Chester**: Elsevier, 1987.

XIAO, W. et al. Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2384-2393, 2011.

XU, X. et al. Characterization of konjac glucomannan-gellan gum blend films and their suitability for release of nisin incorporated therein. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 2, p. 192-197, 2007.

YANG, G.; XIONG, X. P.; ZHANG, L. Microporous formation of blend membranes from cellulose/konjac glucomannan in NaOH/thiourea aqueous solution. **Journal of Membrane Science**, v. 201, n. 1-2, p. 161-173, 2002.

YE, X. et al. Condensed state structure and biocompatibility of the konjac glucomannan/chitosan blend films. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 4, p. 532-538, 2006.

YIN, W. et al. Effects of the lyotropic series salts on the gelation of konjac glucomannan in aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 1, p. 68-78, 2008.

YOUNG, R. J.; LOVELL, P. A. **Introduction to Polymers**. 2. Chapman & Hall, 1991.

YU, H. et al. Preparation and characterization of a quaternary ammonium derivative of konjac glucomannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 1, p. 29-40, 2007.

YUAN, N.-Y. et al. Effects of the cooling mode on the structure and strength of porous scaffolds made of chitosan, alginate, and carboxymethyl cellulose by the freeze-gelation method. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 2, p. 349-356, 2009.

ZHANG, Y. Q.; XIE, B. J.; GAN, X. Advance in the applications of konjac glucomannan and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 1, p. 27-31, 2005.

ZHU, C. Science-Based Health Care. **Science**, v. 327, n. 5972, p. 1429-1429, 2010.

APÊNDICE A

Diagramas de Pareto

Para o planejamento experimental realizado neste estudo, as variáveis e as interações estatisticamente significativas em nível de 5% de significância foram apresentadas por Diagramas de Pareto, obtidos com auxílio do *software* Minitab[®] 15. Os diagramas para as respostas G' a 1 Hz e 10 Hz e G'' a 1 Hz e 1 Hz, estão apresentados nas Figuras A.1, A.2, A.3 e A.4, respectivamente.

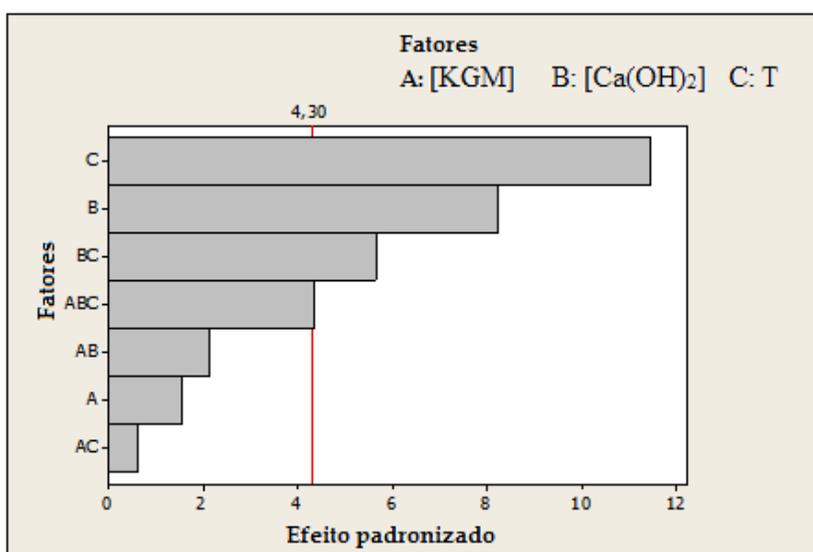


Figura A.1 – Diagrama de Pareto dos efeitos do planejamento fatorial para o módulo elástico a 1 Hz.

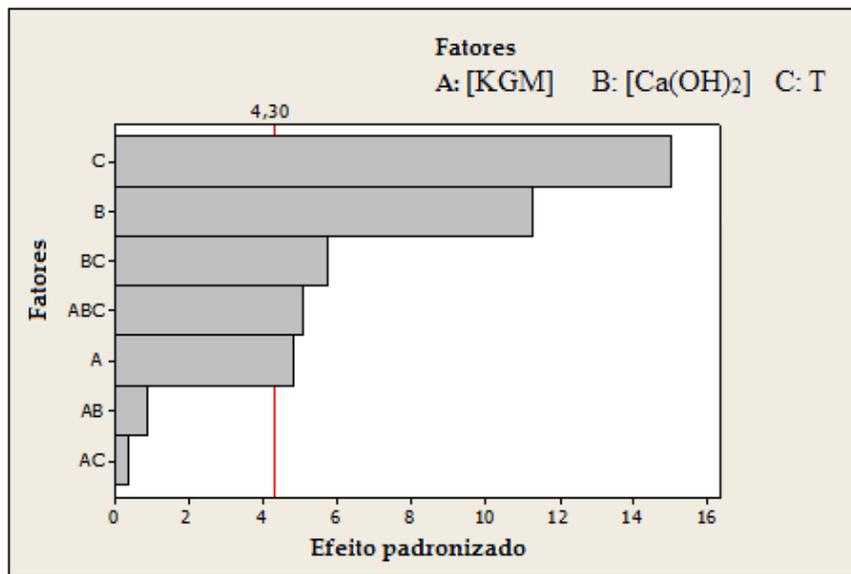


Figura A.2 – Diagrama de Pareto dos efeitos do planejamento fatorial para o módulo elástico a 10 Hz.

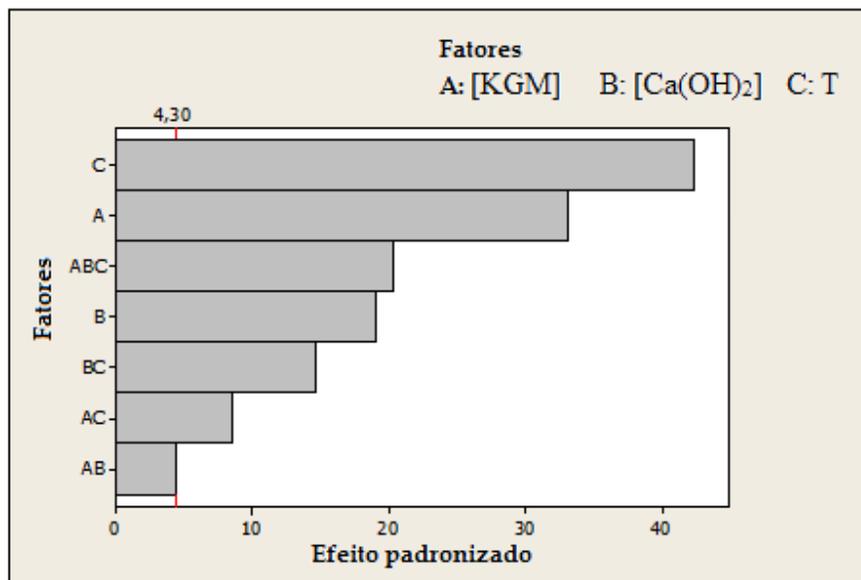


Figura A.3 – Diagrama de Pareto dos efeitos do planejamento fatorial para o módulo viscoso a 1 Hz.

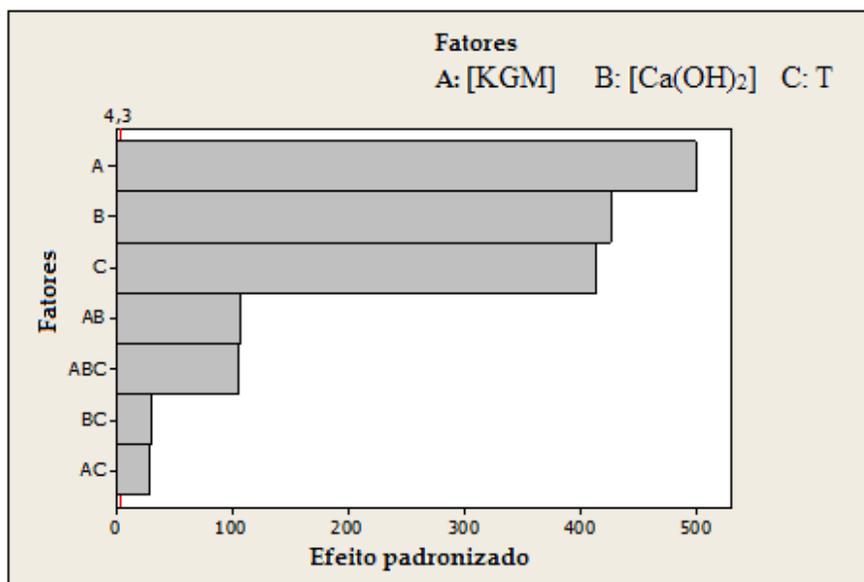


Figura A.4 – Diagrama de Pareto dos efeitos do planejamento fatorial para o módulo viscoso a 10 Hz.

APÊNDICE B
Massa Molecular

A massa molecular da solução de glucomanana foi determinada por cromatografia em gel, o resultado para a amostra em duplicata está expresso na Tabela B.1.

Tabela B.1 – Massa molecular da glucomanana

Amostra	Mn	Mw	Mw/Mn
1	1.52×10^6	1.54×10^6	1.011
2	1.45×10^6	1.46×10^6	1.010