

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**PREPARAÇÃO DE HIDROGÉIS CONTENDO QUITOSANA-
ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO PARA POTENCIAL
APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS**

Dissertação de Mestrado

JÉSSICA FRANCIELLE TEIXEIRA CHAVES PETRY

Porto Alegre, fevereiro de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JÉSSICA FRANCIELLE TEIXEIRA CHAVES PETRY

**PREPARAÇÃO DE HIDROGÉIS CONTENDO QUITOSANA-
ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO PARA POTENCIAL
APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof. Dr. Douglas Gamba
Orientador

Porto Alegre, fevereiro de 2019

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (março/2017) e (fevereiro/2019), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Doutor Douglas Gamba. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. André Ricardo Fajardo

Prof. Dr. Griselda Ligia Barrera de
Galland

Prof. Dr. Irene Teresinha Santos
Garcia

Prof. Dr. Douglas Gamba

Jéssica Francielle Teixeira Chaves
Petry

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família, por todo apoio, conforto, confiança e paciência que sempre tiveram. Ao Emerson, por sempre estar ao meu lado, incentivar, acalmar e ajudar em todos os momentos.

Ao meu orientador, Douglas Gamba, pela confiança depositada, paciência e disposição em ajudar, e pela oportunidade da realização deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório Marco Antônio Justino, Marcelo Gryczak, Eduardo Kuhn, Yuri Rigo e especialmente à Juliana Isidoro, Viktor Saraiva e Geórgia Barcellos por terem me dado suporte tantas vezes.

Agradeço a todos que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A CAPES pela bolsa de estudo.

Sumário

Lista de figuras	6
Lista de tabelas	17
Lista de abreviaturas	19
Resumo	21
Abstract	22
1. Introdução	23
2. Fundamentação teórica	25
2.1 Esqueleto muscular / <i>Volumetric Muscle Loss</i> (VML)	25
2.2 Engenharia de tecidos (ET)	26
2.3 Hidrogéis.....	29
2.3.1 Tipo de reticulação	33
2.3.2 Composição polimérica	34
2.3.3 Resposta a estímulos	35
2.3.4 Método de preparação	36
2.4 Derivados de grafite.....	43
2.5 Condutividade de biomateriais.....	47
2.6 Análises reológicas	47
3. Objetivo	50
3.1 Objetivo Geral.....	50
3.2 Objetivos Específicos.....	50
4. Materiais e métodos.....	51
4.1 Materiais	51
4.2 Metodologia	51
4.2.1 Síntese do PEG com grupos reticuláveis (PEG-MA).....	51

4.2.2 Síntese de óxido de grafeno.....	52
4.2.3 Síntese de quitosana-óxido de grafeno reduzido (CS-rGO).....	52
4.2.4 Preparação de hidrogéis	53
4.3 Caracterizações.....	56
4.3.1 Caracterização do PEG-MA	56
4.3.2 Caracterização do GO e CS-rGO.....	57
4.3.3 Caracterização dos hidrogéis	57
5. Resultados e Discussão.....	61
5.1 Funcionalização do PEG	61
5.2 Síntese do óxido de grafeno e da quitosana-óxido de grafeno reduzido.....	62
5.3 Preparação e caracterização dos hidrogéis.....	64
5.3.1 Hidrogéis de quitosana com óxido de grafeno reduzido (CS-rGO) (com diferentes concentrações de óxido de grafeno)	65
5.3.2 Hidrogéis de CS-rGO contendo diferentes concentrações de PEG- MA	80
5.3.3 Hidrogéis de CS-rGO contendo diferentes concentrações de quitosana.....	86
5.3.4 Hidrogéis contendo proporção equivalente de CS:rGO.....	95
6. Conclusões	99
7. Referências Bibliográficas.....	101
8. APÊNDICE.....	108

Lista de figuras

Figura 1. Esquema demonstrando as etapas fundamentais da aplicação de <i>scaffolds</i> como substitutos na engenharia de tecidos. Adaptado de Noh e colaboradores.	27
Figura 2. Principais características para a fabricação de um <i>scaffold</i> com aplicação em engenharia de tecidos.	29
Figura 3. Imagem mostrando a estrutura tridimensional porosa de hidrogéis. Adaptado de Venugopal.	30
Figura 4. Ilustração da cinética de intumescimento dos hidrogéis.	32
Figura 5. Esquema mostrando a bioconjugação entre as cadeias do <i>scaffold</i> com as células em um hidrogel. Adaptado de Ahadian e colaboradores. .	33
Figura 6. Esquema representativo de hidrogéis reticulados quimicamente e fisicamente. Adaptado de Aouada e colaboradores.	34
Figura 7. Esquema ilustrando um hidrogel semi-IPN e IPN. Adaptado de Hoare.	35
Figura 8. Esquema ilustrando a formação de hidrogéis de complexo poli iônico. Adaptado de Gulrez e colaboradores.	36
Figura 9. Esquema da formação do hidrogel iônico de alginato com cloreto de cálcio.	37
Figura 10. Esquema de formação do hidrogel de poli(álcool vinílico) (PVA) utilizando o glutaraldeído como agente reticulante. Adaptado de Reis e colaboradores.	37
Figura 11. Esquema da reação radicalar da formação de hidrogéis através de ligações duplas terminais. Adaptado de Jun e colaboradores.	38
Figura 12. Estrutura molecular do biopolímero quitosana.	41
Figura 13. Estrutura química do grafeno (A), óxido de grafeno (B) e óxido de grafeno reduzido (C).	45

Figura 14. Esquema da reação de redução do óxido de grafeno utilizando o biopolímero quitosana como agente redutor.....	46
Figura 15. Foto da solução da quitosana-óxido de grafeno reduzido antes e depois da reação de redução.....	53
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H do PEG antes (a) e depois da funcionalização com anidrido metacrílico (b) em CDCl_3	62
Figura 17. Difratoogramas de raio X do grafite, do óxido de grafeno sintetizado (GO), da quitosana pura (CS) e da quitosana-óxido de grafeno reduzido (CS-rGO).....	63
Figura 18. Espectro de absorção no UV-Visível para as soluções de óxido de grafeno (GO) e quitosana-óxido de grafeno reduzido (CS-rGO).....	64
Figura 19. Foto dos hidrogéis contendo 10% PEG-MA.....	65
Figura 20. Foto dos hidrogéis preparados na placa de poços contendo PEG-MA (A), PEG-MA + CS-rGO 0,0025% GO (B), PEG-MA + CS-rGO 0,005% GO (C) e PEG-MA + CS-rGO 0,01% GO (D).	65
Figura 21. Gráficos do grau de intumescimento em função do tempo para os hidrogéis de 10 % PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores APS e SBS. 66	66
Figura 22. Gráficos do grau de intumescimento em função do tempo para os hidrogéis de 10 % PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores APS e TEMED.	67
Figura 23. Gráficos do grau de intumescimento em função do tempo para os hidrogéis de 10 % PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.	67
Figura 24. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10% PEG-MA, 10 %	

PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.70

Figura 25. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10% PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha). 72

Figura 26. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10% PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (10 mmol L^{-1}). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s..... 75

Figura 27. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10% PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (1 mmol L^{-1}). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s. 76

Figura 28. Gráfico da análise de condutividade elétrica para os hidrogéis de 10 % PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED. A análise foi realizada a 20°C..... 77

Figura 29. Termograma de TGA para os hidrogéis secos contendo 10 % PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 %

CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.	79
Figura 30. Imagens de MEV dos hidrogéis contendo apenas PEG-MA (A) e de um hidrogel contendo CS-rGO (B).	80
Figura 31. Gráfico do grau de intumescimento em função do tempo para os hidrogéis de 5 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO e 20 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores persulfato de potássio e TEMED. 81	81
Figura 32. Gráficos de reologia da análise de oscilação da amplitude da deformação para os hidrogéis contendo 5 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO e 20 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.	82
Figura 33. Gráficos de reologia obtidos através da análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 5 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO e 20 % PEG + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).	83
Figura 34. Gráfico da análise de condutividade para os hidrogéis de 5 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO e 20-MMA % PEG + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.	85
Figura 35. Gráfico do grau de intumescimento em função do tempo para os hidrogéis de 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 1 % CS-rGO 0,01 % GO e 10 % PEG-MA + 2 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.	87
Figura 36. Gráficos de reologia da análise de oscilação da amplitude da deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 1 % CS e 10 % PEG-MA + 2 % CS utilizando como sistema de	

iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.....	89
Figura 37. Gráficos de reologia da análise de oscilação da amplitude da deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 1 % CS-rGO 0,01 % GO e 10 % PEG-MA + 2 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.....	89
Figura 38. Gráficos de reologia obtidos através da análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 1 % CS e 10 % PEG-MA + 2 % CS utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).....	90
Figura 39. Gráficos de reologia obtidos através da análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 1 % CS-rGO 0,01 % GO e 10 % PEG-MA + 2 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).	91
Figura 40. Gráfico da análise de condutividade elétrica para os hidrogéis de 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 1 % CS e 10 % PEG-MA + 2 % CS utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.	94
Figura 41. Gráfico da análise de condutividade elétrica para os hidrogéis de 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 1 % CS-rGO 0,01 % GO e 10 % PEG-MA + 2 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.	94
Figura 42. Gráfico do grau de intumescimento em função do tempo para os hidrogéis de 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,5 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.....	96

Figura 43. Gráfico de reologia obtido através da análise de oscilação da frequência para o hidrogel contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,5 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS + TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).	97
Figura 44. Gráfico da análise de condutividade elétrica para os hidrogéis de 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,5 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.	98
Figura 45. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10% PEG-MA utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.	108
Figura 46. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.....	108
Figura 47. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.....	109
Figura 48. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.....	109
Figura 49. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.....	110

- Figura 50. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10% PEG-MA, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha)..... 110
- Figura 51. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha). 111
- Figura 52. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha). 111
- Figura 53. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha). 112
- Figura 54. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha). 112
- Figura 55. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10% PEG-MA, utilizando o sistema de iniciadores

PPS e TEMED (10 mmol L ⁻¹). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.	113
Figura 56. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (10 mmol L ⁻¹). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.....	113
Figura 57. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (10 mmol L ⁻¹). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.	114
Figura 58. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (10 mmol L ⁻¹). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.	114
Figura 59. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (10 mmol L ⁻¹). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.	115
Figura 60. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10% PEG-MA, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (1 mmol L ⁻¹). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.	115
Figura 61. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (1 mmol L ⁻¹). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.	116
Figura 62. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO,	

utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (1 mmol L ⁻¹). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.	116
Figura 63. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (1 mmol L ⁻¹). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.	117
Figura 64. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 5 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.	117
Figura 65. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 20 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.	118
Figura 66. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 5 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).	118
Figura 67. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 20 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).	119
Figura 68. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 1 %	

CS, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.....	119
Figura 69. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 2 % CS, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.....	120
Figura 70. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 1 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.....	120
Figura 71. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 2 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.....	121
Figura 72. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 1 % CS, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).....	121
Figura 73. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 2 % CS, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).....	122
Figura 74. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 1 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz.	

Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha). 122

Figura 75. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 2 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha). 123

Lista de tabelas

Tabela 1. Classificação dos polímeros de fontes naturais em polissacarídeos, polipeptídeos e polinucleotídeos. Adaptado de Yadav e colaboradores. ...	39
Tabela 2. Descrição das proporções dos reagentes da síntese de quitosana-óxido de grafeno reduzido (CS-rGO).	53
Tabela 3. Composição dos hidrogéis com diferentes proporções de óxido de grafeno e sistemas de iniciadores utilizados.	55
Tabela 4. Composição dos hidrogéis contendo diferentes quantidades de PEG-MA.....	55
Tabela 5. Composição dos hidrogéis preparados com diferentes proporções de quitosana.....	56
Tabela 6. Valores da média e desvio padrão do grau de intumescimento máximo para os hidrogéis preparados utilizando diferentes sistemas de iniciadores.	68
Tabela 7. Valores de média e desvio padrão dos módulos de elasticidade (G') e módulos de perda (G'') obtidos para os hidrogéis estudados a partir da análise de oscilação da frequência com 1 e 10 Hz.	73
Tabela 8. Valores de média e desvio padrão da condutividade elétrica obtida para os hidrogéis através da Equação 2.	78
Tabela 9. Valores de média e desvio padrão do grau de intumescimento para os hidrogéis com diferentes quantidades de PEG-MA depois de 24 horas.	81
Tabela 10. Valores de módulo de elasticidade (G') e módulo de perda (G'') obtidos para os hidrogéis estudados a partir da análise de oscilação da frequência com 1 e 10 Hz.	84
Tabela 11. Valores de condutividade obtidos para os hidrogéis através da Equação 2.	86
Tabela 12. Valores de média e desvio padrão do grau de intumescimento máximo para os hidrogéis.	88

Tabela 13. Valores de módulo de elasticidade (G') e módulo de perda (G'') obtidos para os hidrogéis estudados a partir da análise de oscilação da frequência com 1 e 10 Hz.	93
Tabela 14. Valores de condutividade obtidos para os hidrogéis através da Equação 2.	95
Tabela 15. Valores de média e desvio padrão do grau de intumescimento máximo para os hidrogéis.	96
Tabela 16. Valores de módulo de elasticidade (G') e módulo de perda (G'') obtidos para os hidrogéis estudados a partir da análise de oscilação da frequência com 1 e 10 Hz.	97
Tabela 17. Valores de condutividade elétrica obtidos para os hidrogéis através da Equação 2.	98

Lista de abreviaturas

APS	Persulfato de amônio
CS	Quitosana
CS-rGO	Quitosana-óxido de grafeno reduzido
DMA	Análise dinâmico-mecânica
DRX	Difração de raio x
ET	Engenharia de tecidos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G'	Módulo de armazenamento ou elasticidade
G''	Módulo de perda ou viscosidade
GO	Óxido de grafeno
IPN	Redes poliméricas interpenetrantes
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PAA	Poli(ácido acrílico)
PAAm	Poliacrilamida
PEG	Polietilenoglicol
PEG-MA	Polietilenoglicol dimetacrilato
PGA	Poli(ácido glicólico)
pHEMA	Poli(metacrilato de 2-hidroxietila)
PLA	Poli(ácido láctico)
PNiPAAm	Poli(<i>N</i> -isopropil acrilamida)
PPS	Persulfato de potássio
PVA	Poli(álcool vinílico)
Q	Grau de inumescimento
rGO	Óxido de grafeno reduzido
RMN	Ressonância magnética nuclear
SBS	Bissulfito de sódio
semi-IPN	Redes poliméricas semi-interpenetrantes
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilenodiamina
TGA	Análise termogravimétrica
VML	<i>Volumetric muscle loss</i>

Δ Deslocamento químico
 Σ Condutividade

Resumo

Neste trabalho, hidrogéis constituídos de polietilenoglicol dimetacrilato (PEG-MA) e quitosana-óxido de grafeno reduzido (CS-rGO) foram preparados visando sua posterior utilização em estudos de engenharia de tecidos voltados para a regeneração do tecido muscular. Para isso, primeiramente o PEG foi funcionalizado com grupos reticulantes através da reação com anidrido metacrílico. A modificação pôde ser confirmada através da análise de RMN de ^1H , pelo aparecimento do sinal dos hidrogênios da dupla ligação em 5,5 ppm e 6,2 ppm. O óxido de grafeno foi reduzido termicamente pela reação com a quitosana (CS-rGO), sendo preparadas soluções com diferentes proporções entre estes reagentes. A CS-rGO foi obtida com sucesso e seus sinais característicos puderam ser observados através de UV-visível e difração de raio X. As análises mostraram a redução dos grupos oxigenados presentes no óxido de grafeno. Os hidrogéis foram obtidos por polimerização radicalar utilizando persulfato de potássio como iniciador e *N,N,N',N'*-tetraetilenodiamina (TEMED) como ativador. Primeiramente, hidrogéis com diferentes quantidades de óxido de grafeno reduzido foram preparados. O hidrogel que apresentou melhor desempenho em relação às propriedades mecânicas foi o de composição 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO com 0,01 % GO. Por fim, foi avaliada a variação da concentração de PEG e CS na composição dos hidrogéis contendo 0,01 % GO. Os hidrogéis foram analisados através de grau de intumescimento, análises reológicas e condutividade elétrica. O grau de intumescimento e a condutividade apresentaram valores constante para os hidrogéis contendo rGO. As análises reológicas apresentaram valores de módulo de elasticidade dentro da faixa encontrada para tecidos musculares para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA e 0,5 % CS-rGO.

Palavras-chave: regeneração do tecido muscular, PEG, quitosana, óxido de grafeno reduzido, hidrogel, biomateriais, *scaffolds*.

Abstract

In this study, polyethyleneglycol (PEG) chitosan-reduced graphene oxide (CS-rGO) hydrogels were prepared for potential applications in tissue engineering focused on muscle regeneration. PEG was functionalized with methacrylate groups by reaction with methacrylic anhydride. The modification was confirmed by ^1H NMR analysis where the presence of olefinic hydrogens from C=C bond of methacrylate group in 5.5 ppm and 6.2 ppm were detected. Graphene oxide was thermally reduced by reaction with chitosan (CS-rGO) and solutions with different ratio of them were prepared. CS-rGO was successfully obtained and its typical signals could be observed by UV-visible and X-ray diffraction analyses. The analyses showed the reduction of the oxygen groups present in the graphene oxide. PEG hydrogels containing CS-rGO were obtained by radical polymerization using potassium persulfate as initiator and *N,N,N',N'*-tetraethylenediamine (TEMED) as activator. Hydrogels with different amounts of reduced graphene oxide were prepared. The hydrogel that showed the best performance was the composition of 10 % PEG-MA + 0.5 % CS-rGO with 0.01 % GO. Finally, the variation of the PEG and CS concentration in the composition was evaluated for the 0.01 % GO containing hydrogels. The hydrogels were analyzed by swelling degree, rheological analysis and electrical conductivity. Swelling degree and electrical conductivity presented constant values for the hydrogel containing rGO. The rheological analyzes presented elastic modulus values within the range found for muscle tissues for hydrogels containing 10% PEG-MA and 0.5% CS-rGO.

Key words: muscle tissue regeneration, PEG, chitosan, reduced graphene oxide, hydrogel, biomaterials, *scaffolds*.

1. Introdução

O esqueleto muscular é responsável por papéis muito importantes no corpo humano, incluindo controle de membros e respiração. Ele corresponde a mais de 40% da massa do corpo humano e possui a habilidade de regeneração após ferimentos. Entretanto, quando um grande volume de músculo é perdido (*volumetric muscle loss* – VML) a resposta regenerativa não é eficaz. Desta forma, há formação de cicatrizes ou danos musculares e os tratamentos são limitados e normalmente estão associados a morbidade.

A engenharia de tecidos (ET) é um campo multidisciplinar que estuda formas de criar *scaffolds*, utilizando biomateriais, para substituir tecidos ou órgãos lesionados. A necessidade de uma interface que fizesse o papel de matriz extracelular (MEC) no organismo impulsionou o estudo de *scaffolds* biodegradáveis. A MEC é composta por uma mistura de várias biomoléculas que são essenciais para tecidos específicos e interliga células, tecidos e órgãos.

O grande desafio no desenvolvimento de um substituto biológico funcional está na capacidade de mimetizar as características complexas do tecido nativo. Vários substitutos sintéticos para a MEC têm sido estudados. Dentre eles, os *scaffolds* polímeros são amplamente estudados por suas propriedades físicas e mecânicas. Os hidrogéis, por exemplo, são materiais formados por uma rede polimérica tridimensional e hidrofílica, capaz de absorver e reter grandes quantidades de água ou fluidos biológicos. Estes materiais têm atraído muito interesse como *scaffolds* para crescimento celular na ET por suas propriedades de estrutura tridimensional porosa, biodegradabilidade, excelente absorção de fluidos e propriedades elásticas e químicas semelhantes à da MEC e de alguns tecidos. Essas características os tornam capazes de criar ambientes ideais para o desenvolvimento de células e tecidos.

Os hidrogéis podem ser obtidos a partir de polímeros sintéticos, naturais ou ambos. Hidrogéis obtidos de polímeros naturais, como polissacarídeos e

proteínas, têm maior interação no meio biológico e celular, porém possuem propriedades mecânicas pobres, baixa estabilidade e reprodutibilidade. Muitos polissacarídeos naturais como alginato, ácido hialurônico e quitosana, apresentam estrutura química similar aos componentes da MEC e dos tecidos conectivos e, portanto, proporcionam hidrogéis com permeabilidade controlada. Em virtude de suas características têm sido muito estudados como *scaffolds* celulares tridimensionais. Apesar da excelente biocompatibilidade, os polímeros naturais possuem algumas propriedades desvantajosas quando comparados aos sintéticos, como baixas propriedades mecânicas e alta degradabilidade. Hidrogéis obtidos a partir de polímeros sintéticos, por sua vez, possuem ótimas propriedades químicas e mecânicas, porém não são eficientes em interações celulares e podem desencadear uma resposta inflamatória do organismo. Os polímeros sintéticos vêm sendo muito utilizados em estudos celulares para aplicações biomédicas. Polímeros hidrofílicos como polietilenoglicol (PEG), poli(acrilamida) e poli(*N*-isopropil acrilamida) são largamente utilizados no preparo de hidrogéis. O PEG, por exemplo, possui baixa toxicidade e imunogenicidade.

As interações entre material e célula envolvem sinais biológicos, químicos, elétricos e mecânicos. Por exemplo, estímulos elétricos podem melhorar a o crescimento e a diferenciação celular de neurônios, cardiomiócitos, mioblastos e células-tronco. Por isso a importância do desenvolvimento de um biomaterial que possa fazer todas essas interações entre a matriz e a célula. Grafeno e seus derivados têm sido estudados como componentes condutores em *scaffolds* para ET.

Neste trabalho foram desenvolvidos materiais na forma de hidrogéis com potencial aplicação em regeneração muscular. Os hidrogéis foram preparados com polietilenoglicol funcionalizado com grupos metacrilato e quitosana funcionalizada com óxido de grafeno reduzido.

2. Fundamentação teórica

2.1 Esqueleto muscular / *Volumetric Muscle Loss* (VML)

O tecido que compõe o esqueleto muscular corresponde a mais de 40 % da massa total do corpo humano e assume papéis muito importantes, incluindo controle de membros e respiração. Diferentemente de outros tecidos, o tecido muscular possui a habilidade de regeneração após ferimentos. Entretanto, esta resposta regenerativa é limitada quando um grande volume muscular é perdido. Assim, não há uma recuperação total do tecido, o que resulta em cicatrizes ou danos musculares.¹

Difusões musculares afetam cerca de 561 milhões de pessoas no mundo e representam uma significativa carga social e econômica.¹ A reparação incompleta após a perda de uma grande porção do tecido muscular (*volumetric muscle loss* - VML) contribui para a incapacidade crônica de muitos pacientes, afetando sua qualidade de vida. Economicamente, estima-se que há um custo de cerca de US\$ 80.000 por paciente nos dois primeiros anos após as lesões. Dados dos Estados Unidos mostram que este impacto econômico ultrapassa US\$ 400 bilhões por ano.^{2,3}

Os tratamentos para a perda de tecido muscular (*volumetric muscle loss* – VML) são limitados e normalmente estão associados a morbidade. Dentre os procedimentos cirúrgicos mais comuns para esse tipo de doença estão a transferência de tecido, transplantes e próteses para recuperar lesões de tamanhos críticos.⁴⁻⁷

Em virtude da limitação de opções terapêuticas para esse tipo de condição um campo de pesquisa que vem ganhando destaque como nova estratégia é a ET.⁷

2.2 Engenharia de tecidos (ET)

A origem do termo engenharia de tecidos (ET) não é totalmente esclarecida, mas a definição mais aceita foi introduzida em 1988 por Robert Nerem no *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*. Na ocasião, Robert Nerem propôs a ET como a aplicação de princípios de engenharia e ciências da vida para a compreensão da estrutura e das funções dos tecidos e a busca de substitutos biológicos para reparação e manutenção de suas funções. A partir dessa definição muitas metodologias foram estudadas para a fabricação de *scaffolds*, que passaram de bidimensional (2D) para tridimensional (3D) com o desenvolvimento de novas tecnologias. Os *scaffolds* 3D possibilitaram o cultivo de células em um ambiente que reproduz com maior precisão os tecidos naturais.⁸

Essa nova ciência vem sendo estudada arduamente nas últimas décadas e requer estreita colaboração entre pesquisadores de diferentes áreas como química, biologia, medicina, ciências dos materiais e física, entre outras.⁹ Esse campo tem beneficiado os avanços na compreensão da relação da engenharia de materiais com as células. Atualmente já foram investigados quase todos os tecidos humanos em variados graus.¹⁰ As estratégias estudadas pela ET envolvem o desenvolvimento de *scaffolds*, que também chamados de *scaffolds*, utilizando biomateriais, células e moléculas bioativas que possam auxiliar na substituição dos tecidos e órgãos lesionados.^{5,7}

O estudo de *scaffolds* biodegradáveis começou pela necessidade de uma interface que fizesse o papel da matriz extracelular (MEC) no organismo, interligando células, tecidos e órgãos.¹¹ A MEC é composta por uma mistura de várias biomoléculas que são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e manutenção das células e tecidos do organismo.⁵

A fabricação de um substituto sintético para a MEC é um desafio em virtude da sua complexidade estrutural e funcional.⁵ O desenvolvimento dos tecidos sintéticos na ET é realizado semeando células no *scaffold* e cultivando em meios de cultura contendo fatores de crescimento. A Figura 1 mostra um esquema das principais etapas para um *scaffold* 3D ser aplicado à ET. Essa

matriz sintética é a base para regular diferentes comportamentos celulares, tais como migração, adesão, proliferação e diferenciação, tendo como objetivo formar uma MEC artificial para as células.⁵

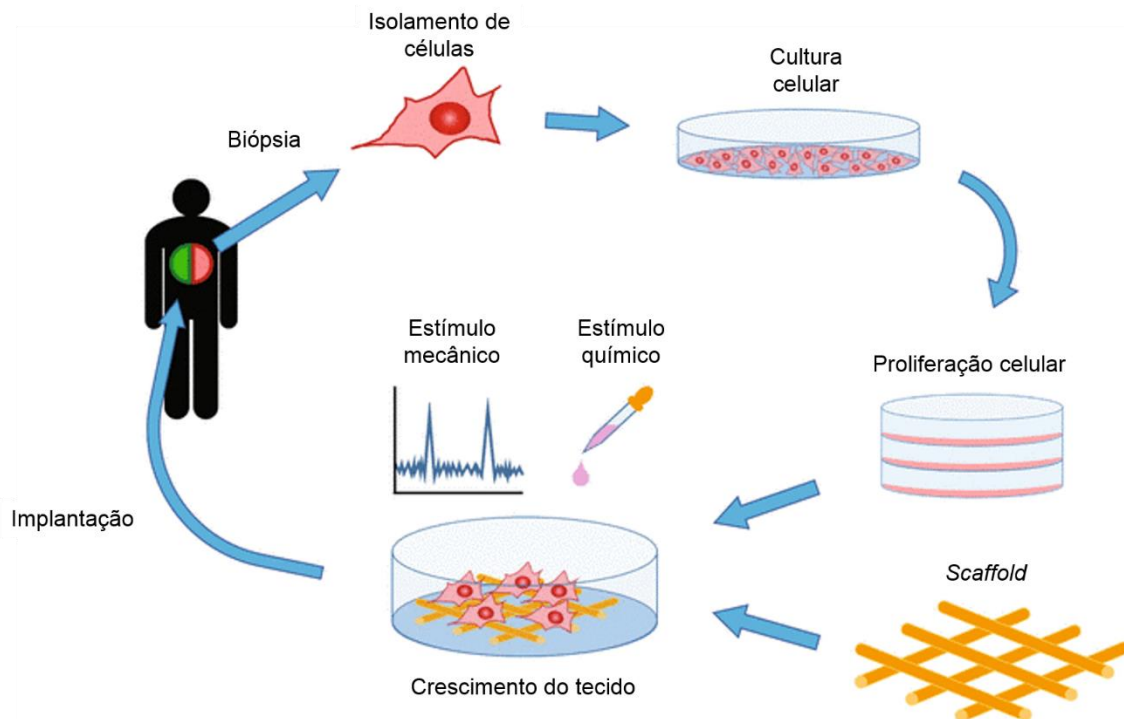


Figura 1. Esquema demonstrando as etapas fundamentais da aplicação de *scaffolds* como substitutos na engenharia de tecidos. Adaptado de Noh e colaboradores.¹²

Para cada tecido presente no corpo humano são necessários diferentes requisitos para fabricação de *scaffolds*. Estes devem fornecer formato, funções biomecânicas e biocompatibilidade necessários para recuperar o tecido. Além disso, as características únicas dos tecidos naturais exigem maior complexidade das matrizes sintéticas para que alcancem um melhor desempenho na recuperação.⁷

Um exemplo de complexidade estrutural para a preparação de *scaffolds* remete ao uso destes materiais para a regeneração do esqueleto muscular. Por se tratar de um tecido biomecânico ativo, este requer uma inervação motora. Portanto, o *scaffold* precisa fornecer um ambiente onde ocorra um alinhamento paralelo das fibras musculares, além de uma vascularização adequada para reestabelecer as suas funções fisiológicas. Além disso, quando há perda de um grande volume de tecido muscular o *scaffold* utilizado também precisa ser

capaz de preencher todo o defeito proveniente da lesão, a qual possui formatos bastante irregulares em sua maioria.¹⁰

Idealmente, os *scaffolds* desenvolvidos para ET devem possuir algumas características importantes para desempenhar seu papel de forma adequada. Os três principais requisitos para a utilização de um *scaffold* incluem uma estrutura tridimensional para o crescimento do tecido, um ambiente onde ocorra cultivo e proliferação celular e direcionamento mecânico para a formação deste novo tecido.¹⁰

Contudo, vários outros critérios foram sendo agregados a estes à medida que a pesquisa na área ganhou uma maior abrangência. Na Figura 2 estão descritas, resumidamente, as características essenciais para os *scaffolds* utilizados na ET.

Os *scaffolds* tridimensionais aplicados à ET são fabricados utilizando biomateriais. A definição de biomaterial é: qualquer substância, natural ou sintética, passível de ser implantada em um organismo com a função de recuperar ou substituir tecidos ou órgãos.¹³

Scaffolds poliméricos têm sido amplamente estudados como substitutos da MEC.¹¹ As matrizes para ET podem ser fabricadas a partir de diversos materiais, porém os polímeros têm mostrado maior versatilidade e resultados promissores. Os polímeros possuem excelente processabilidade, propriedades mecânicas e taxa de degradabilidade ajustáveis e essas características os tornam materiais adequados para esse tipo de aplicação.¹⁴

Existem diversas classes de *scaffolds*, os quais se destacam os *scaffolds* porosos na forma de espumas sólidas¹⁵, os *scaffolds* constituídos de microesferas¹⁶, os *scaffolds* fibrosos à base de nanofibras¹⁷, os hidrogéis¹⁸, entre outros. Os métodos de preparação dos diferentes tipos de *scaffolds* apresentam vantagens e desvantagens, a técnica apropriada deve ser selecionada para atender os requisitos para o tipo específico de tecido.¹⁹

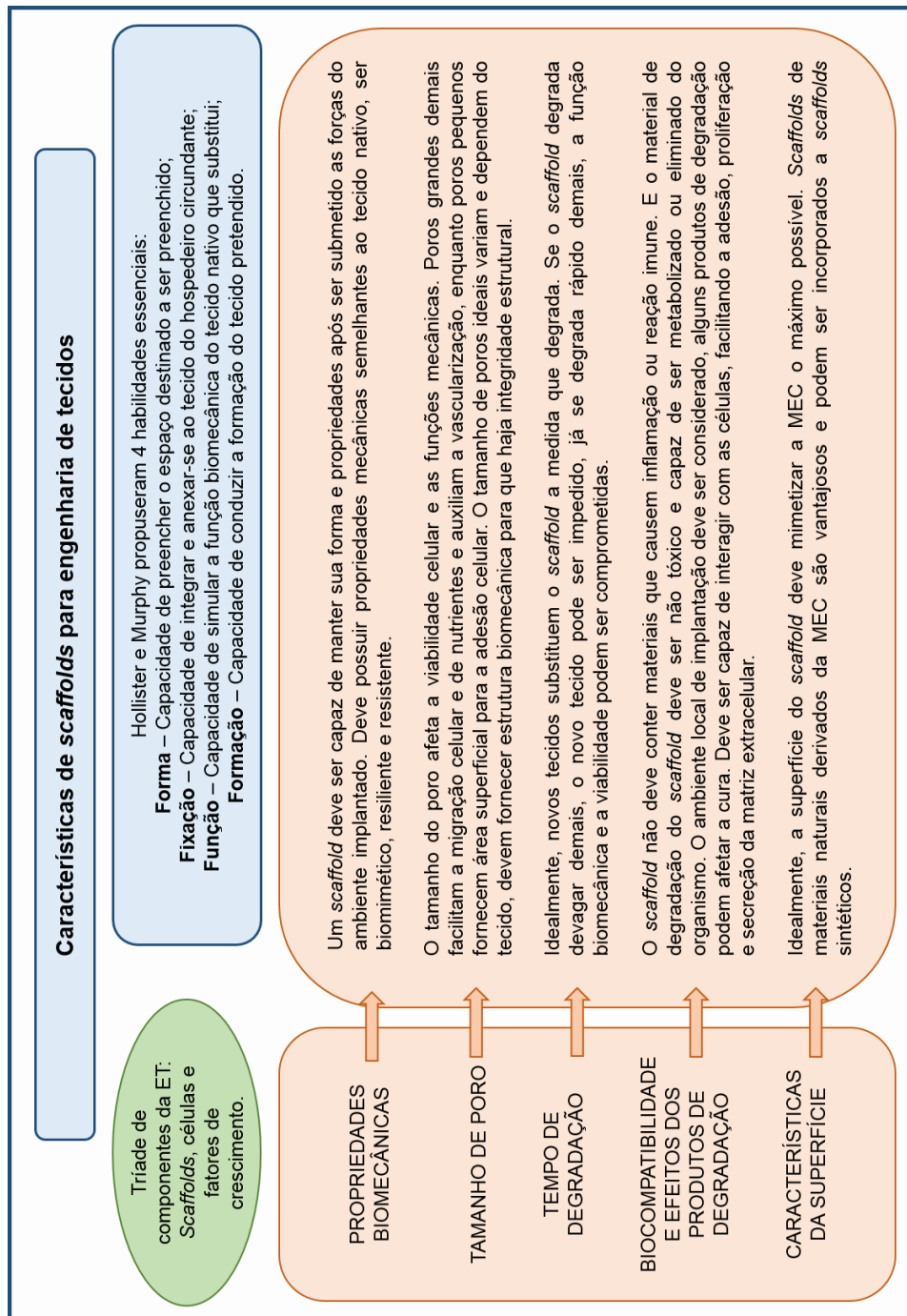


Figura 2. Principais características para a fabricação de um scaffold com aplicação em engenharia de tecidos.^{10,11,20}

2.3 Hidrogéis

Hidrogéis são redes poliméricas 3D reticuladas, como mostrado na Figura 3, que possuem a característica de absorverem e reterem grandes

quantidades de água e propriedades físico-químicas semelhantes a da MEC.^{21,22}

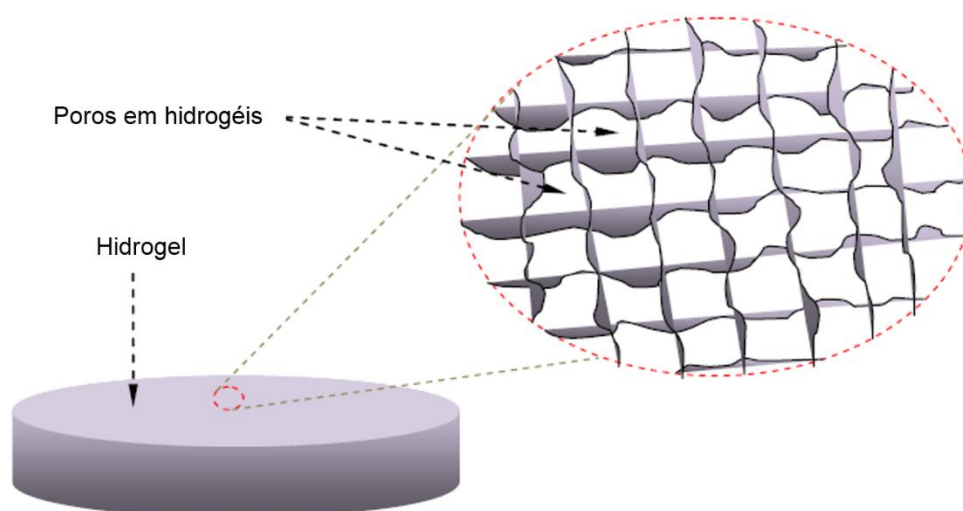


Figura 3. Imagem mostrando a estrutura tridimensional porosa de hidrogéis. Adaptado de Venugopal.²³

O primeiro hidrogel foi desenvolvido por Wichterle e Lim, nos anos 60, constituído de poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (pHEMA). Esse hidrogel foi a base para a fabricação das primeiras lentes de contato gelatinosas.²⁴ Desde então, as pesquisas envolvendo hidrogéis cresceram e diversas aplicações foram estudadas como no tratamento de queimaduras²⁵, em lentes de contato²⁶, como *scaffolds* para ET²⁷, em libertação controlada de fármacos²⁸, como implantes de músculos artificiais²⁹ e ossos esponjosos³⁰, na substituição de cartilagem³¹, entre outros. Além disso, podem ser encontrados em cosméticos³², produtos de higiene pessoal³³ e na agricultura. Alguns exemplos da aplicação de hidrogéis na agricultura são como reservatórios de água e na liberação controlada de agroquímicos.^{34,35}

Os hidrogéis têm atraído muito interesse como *scaffolds* para crescimento celular na ET por suas propriedades de estrutura tridimensional porosa, biodegradabilidade, excelente absorção de fluidos e propriedades elásticas semelhantes aos tecidos. Essas características os tornam capazes de criar ambientes ideais para o desenvolvimento de um novo tecido.^{21,22} Na implantação, a porosidade do hidrogel permite que ocorra a formação de novos

vasos sanguíneos, o que é um requisito chave para vascularização do novo tecido.³⁶

Os hidrogéis podem servir como *scaffold* para o crescimento celular bidimensional ou como um microambiente tridimensional. Eles possuem propriedades mecânicas ajustáveis, através de agentes reticulantes ou composição química, alterando grau de reticulação e intumescimento. Essas propriedades ajustáveis atraíram muito interesse para o estudo de interações mecânicas, uma vez que as células e o ambiente *in vitro* possuem comunicações mecânicas complexas entre si.³⁷

Diversas aplicações biomédicas têm sido estudadas para hidrogéis, como *scaffolds* para ET, como em liberação controlada de fármacos, veículo para injeção para tratamentos, entre outros. Em cada tipo de aplicação são necessárias diferentes propriedades mecânicas, isso demonstra a versatilidade desse tipo de material.³⁷ Além disso, a capacidade de intumescimento dos hidrogéis é de grande importância quando se trata de aplicações biomédicas. A presença de água na superfície do hidrogel melhora as propriedades biológicas pois causa a redução da energia de Gibbs interfacial em ambiente fisiológico.³⁸

O processo de hidratação do hidrogel ocorre em duas etapas, um processo de difusão seguido de um processo de relaxamento. Primeiramente, as moléculas de água hidratam os grupos hidrofílicos. Depois dessa etapa, a pressão osmótica das cadeias reticuladas permite que a rede absorva mais água.³⁹

A capacidade de absorção de um hidrogel depende de seu grau de reticulação, da natureza de seus constituintes, da natureza da solução e da estrutura tridimensional. Dentre esses, a densidade de reticulação é um dos fatores mais importantes, a qual é determinada pelo número de ligações cruzadas em determinado volume. Quanto mais ligações cruzadas num volume, maior a densidade de reticulação. A Figura 4 apresenta a cinética de intumescimento de hidrogéis.^{40,41}

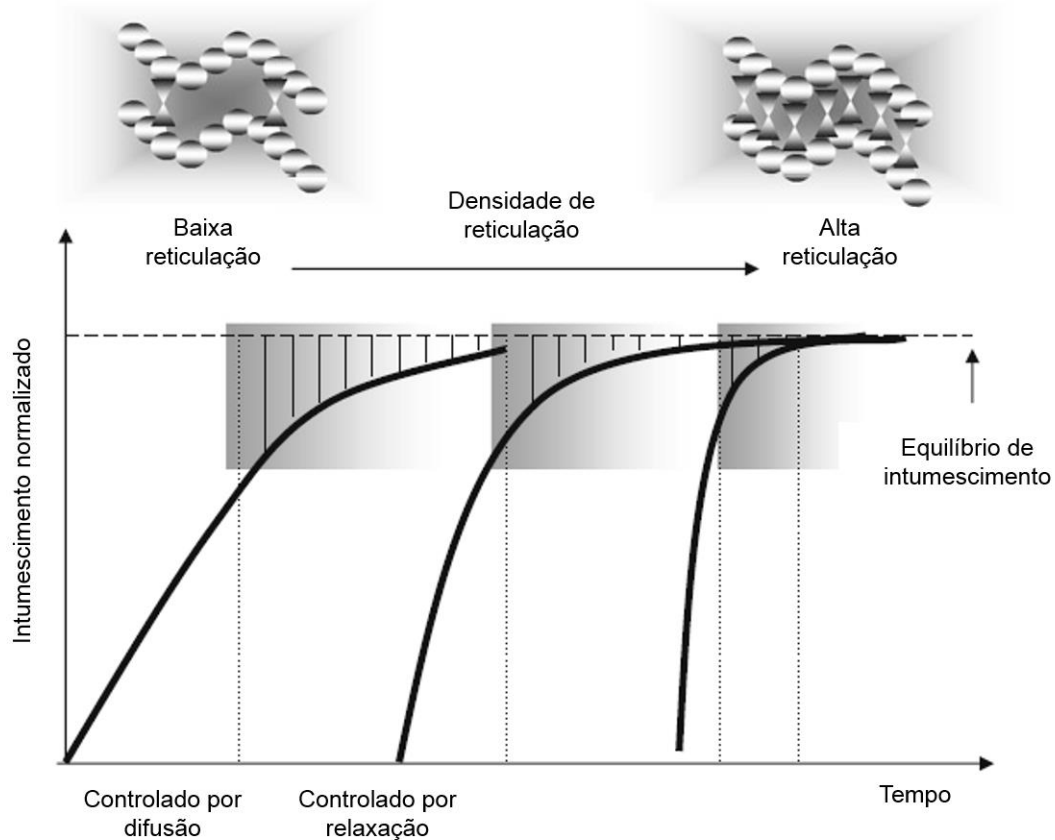


Figura 4. Ilustração da cinética de intumescimento dos hidrogéis.

A densidade de reticulação está relacionada com as propriedades dos hidrogéis, como o módulo de elasticidade, o intumescimento e a difusibilidade. De forma que quando a densidade de reticulação aumenta, o intumescimento e a difusibilidade diminuem com a redução da dimensão da malha e o módulo de elasticidade aumenta.³³

A bioconjugação de hidrogéis é uma abordagem utilizada para melhorar o desempenho usando componentes responsivos a células, como proteínas e peptídeos, que têm alta afinidade para regular comportamentos celulares, como adesão, migração, proliferação e diferenciação celular. A Figura 5 apresenta um esquema demonstrando como ocorre a interação de um hidrogel bioconjugado com as células, as biomoléculas auxiliam na interação do suporte sintético com o meio biológico.⁵

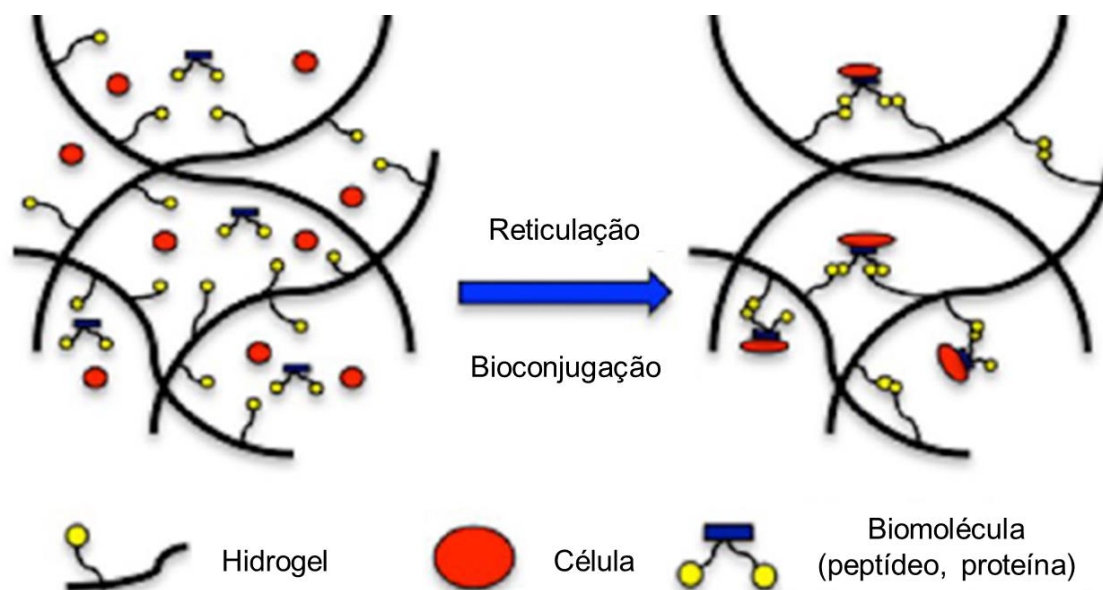


Figura 5. Esquema mostrando a bioconjugação entre as cadeias do *scaffold* com as células em um hidrogel. Adaptado de Ahadian e colaboradores.⁵

Os hidrogéis podem ser classificados de acordo com o tipo de reticulação (física ou química), composição polimérica (homopolímero, copolímero, rede polimérica semi-interpenetrante (semi-IPN) ou rede polimérica interpenetrante (IPN)), resposta a estímulos, método de preparação ou fonte (natural, sintético ou híbrido).

2.3.1 Tipo de reticulação

A formação da rede reticulada pode ocorrer através de ligações químicas ou interações físicas. Os hidrogéis de reticulação física ou reversível são redes tridimensionais formadas por forças associativas capazes de criar ligações cruzadas não covalentes.⁴² A reticulação envolve ligações iônicas, ligações hidrogênio, interações hidrofóbicas ou eletrostáticas. Entretanto, esses hidrogéis geralmente possuem propriedades mecânicas inferiores.⁴³

Os hidrogéis de reticulação química ou permanentes mantêm sua estrutura por ligações covalentes entre as cadeias do polímero. Esses hidrogéis possuem resistência mecânica superior e estabilidade fisiológica controlável. As reações de reticulação química podem ser realizadas através

da adição de um agente reticulante, por radiação, temperatura ou uso de enzimas.⁴³

A Figura 6 ilustra a estrutura de um hidrogel reticulado quimicamente e outro reticulado fisicamente.

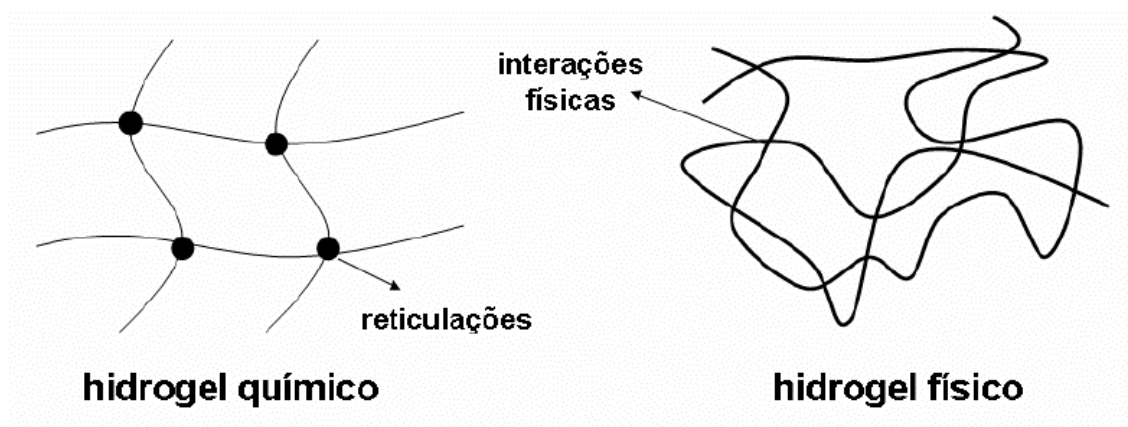


Figura 6. Esquema representativo de hidrogéis reticulados quimicamente e fisicamente. Adaptado de Aouada e colaboradores.⁴⁴

2.3.2 Composição polimérica

A composição polimérica presente no hidrogel pode ser de homopolímero, copolímero, redes poliméricas interpenetrantes (IPN) e redes poliméricas semi-interpenetrantes (semi-IPN).

Os homopolímeros são polímeros formados por um único tipo de monômero. Os copolímeros são polímeros formados por mais de um tipo de monômero, podem ser de configuração aleatória, em bloco ou alternados.⁴⁵

No caso de redes interpenetrantes (IPN), dois ou mais polímeros formam a rede. A formação do hidrogel ocorre pela síntese ou reticulação de um dos polímeros na presença de outro já reticulado. Nas redes semi-interpenetrantes (semi-IPN), o hidrogel é formado por um polímero na presença de outro que permanece dentro da rede formada.⁴⁶ A Figura 7 apresenta um esquema da estrutura de hidrogéis semi-IPN e IPN.

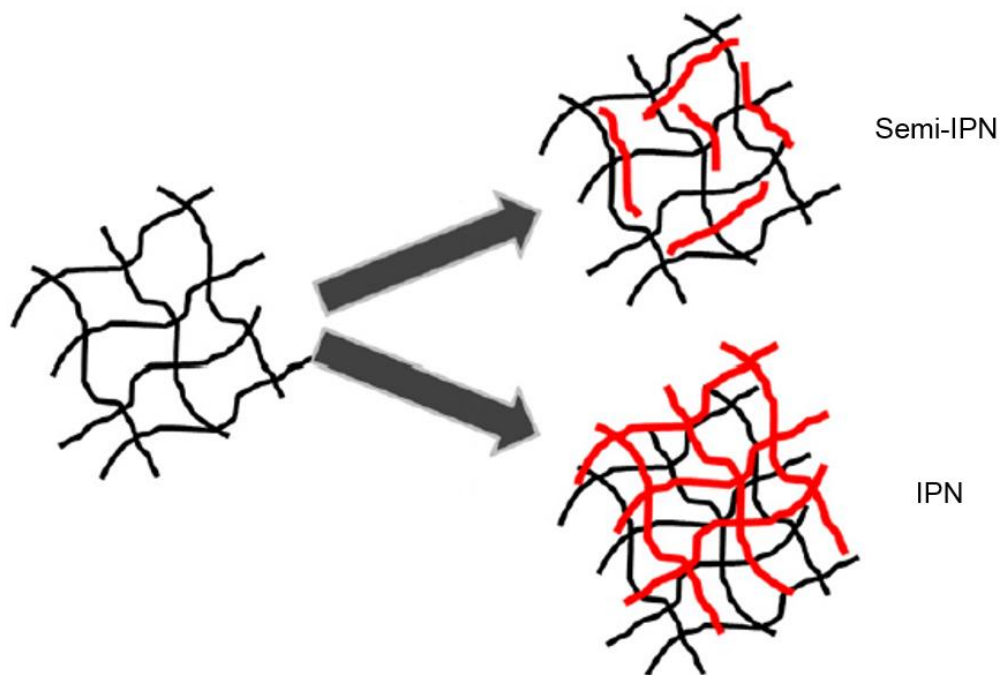


Figura 7. Esquema ilustrando um hidrogel semi-IPN e IPN. Adaptado de Hoare.⁴⁷

2.3.3 Resposta a estímulos

Alguns hidrogéis são formados ou modificados para responderem a alterações no ambiente que está inserido. Os estímulos aos quais eles respondem podem ser de origem física, química ou bioquímica. A resposta ao estímulo pode ocorrer através de mudanças no nível de absorção de água, na estrutura da rede ou na resistência. Estímulos físicos podem ser luz, pressão, campo elétrico ou magnético. Os estímulos químicos podem ser temperatura, pH, presença ou mudança na concentração de moléculas específicas. Por sua vez, os estímulos bioquímicos geralmente estão associados à presença de enzimas.⁴⁸ Rahimi e colaboradores⁴⁹ desenvolveram um hidrogel eletrosensível a base de fibrina e poli(ácido acrílico). Esse hidrogel transforma energia elétrica em trabalho mecânico, que melhora a distribuição celular. A estimulação de 2 horas no período de semeadura, induzida por corrente elétrica alternada, proporcionou melhor penetração celular e alinhamento na construção do tecido.

Este sistema pode ser usado para melhorar as condições de cultivo e semeadura para fabricação *scaffolds* vasculares de engenharia de tecidos.

2.3.4 Método de preparação

Diversos modos de preparação podem ser utilizados para a formação de hidrogéis, como através de complexo polieletrólítico, ligação iônica, ligação hidrogênio, agente reticulante, iniciadores, métodos enzimáticos, adição de Michael, radiação, entre outros. A seguir são mostrados alguns exemplos de modos de preparação de hidrogéis.

2.3.4.1 Hidrogel com complexo polieletrólítico

Os hidrogéis com complexo poli iônico são formados por um poliânion e um policátion, esquema mostrado na Figura 8. Ocorre a formação de complexos solúveis ou insolúveis de acordo com a concentração dos polímeros e o pH do meio.⁵⁰

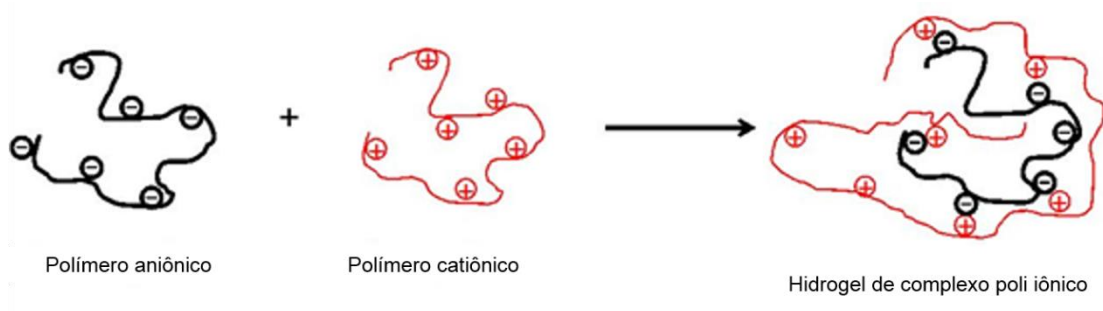


Figura 8. Esquema ilustrando a formação de hidrogéis de complexo poli iônico. Adaptado de Gulrez e colaboradores.⁵¹

2.3.4.2 Interação iônica

A formação dos hidrogéis ocorre pela adição de contra íons bivalente ou trivalentes. A Figura 9 mostra o exemplo do alginato de sódio que é reticulado com íons cálcio.⁵²

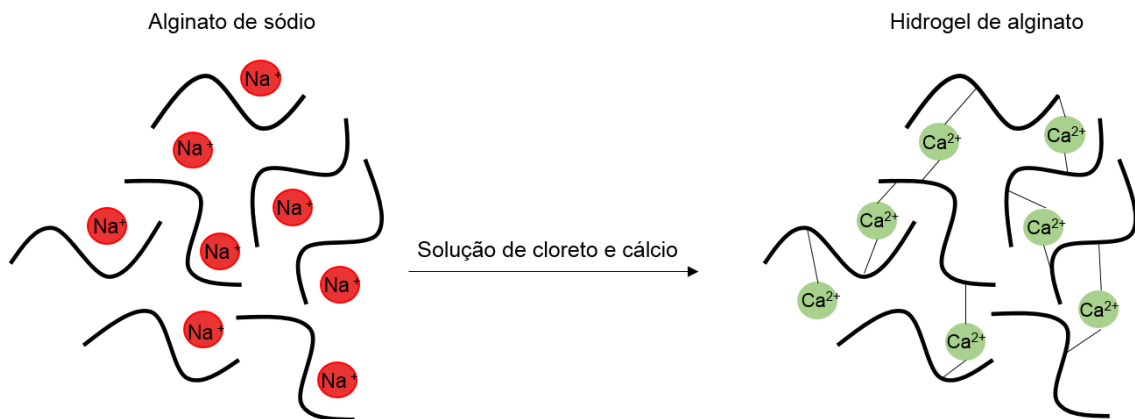


Figura 9. Esquema da formação do hidrogel iônico de alginato com cloreto de cálcio.

2.3.4.3 Utilização de agentes reticulantes

Os agentes reticulantes são moléculas com dois ou mais grupos funcionais capazes de reagir com a cadeia polimérica, formando “pontes” entre duas cadeias.⁵³ A Figura 10 mostra a formação das ligações cruzadas utilizando agentes reticulantes, no caso o glutaraldeído, que é muito utilizado nessa aplicação.

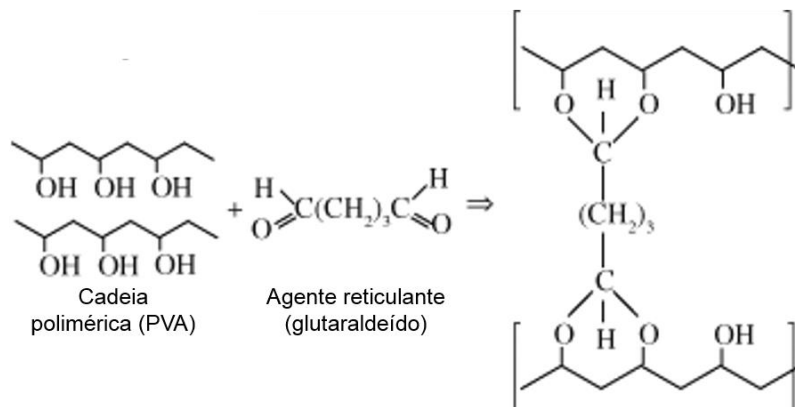


Figura 10. Esquema de formação do hidrogel de poli(álcool vinílico) (PVA) utilizando o glutaraldeído como agente reticulante. Adaptado de Reis e colaboradores.⁵⁴

2.3.4.4 Reticulação por polimerização radicalar

A polimerização radicalar se caracteriza como uma das metodologias mais utilizadas na preparação de hidrogéis. Neste sistema, iniciadores são utilizados para a formação de hidrogéis com polímeros que possuem ou foram modificados com grupos reticulantes, como grupos metacrilato. A iniciação pode acontecer por temperatura, radiação, agentes ativadores, entre outros. A Figura 11 mostra um esquema de um hidrogel formado a partir de um polímero contendo duplas ligações reticuláveis. A reticulação das ligações duplas ocorre pela formação de radicais gerada por um iniciador.⁵⁵

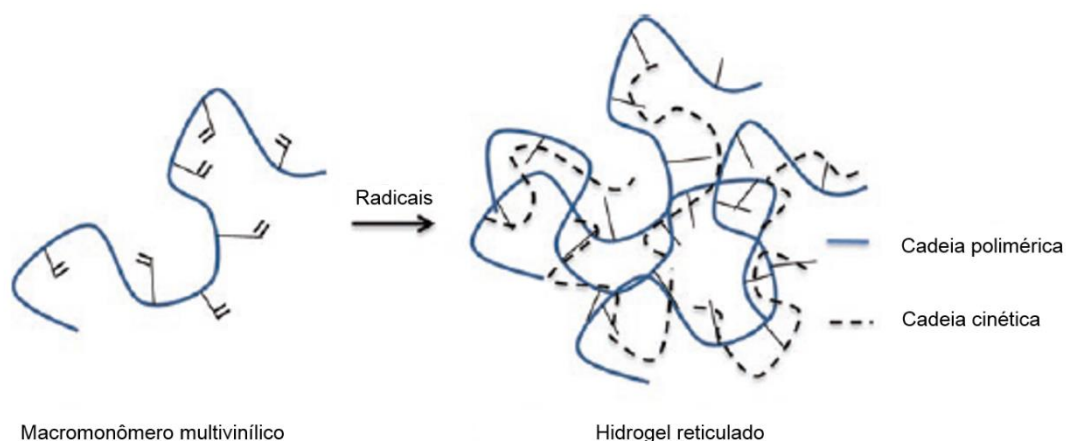


Figura 11. Esquema da reação radicalar da formação de hidrogéis através de ligações duplas terminais. Adaptado de Jun e colaboradores.⁵⁶

2.3.4.5 Fonte dos polímeros utilizados

Os hidrogéis podem ser preparados a partir de polímeros sintéticos, naturais ou ambos. Hidrogéis obtidos de polímeros naturais possuem maior biocompatibilidade enquanto os obtidos de polímeros sintéticos possuem melhores propriedades mecânicas.⁵ As características de cada natureza de polímeros serão abordadas nos itens seguintes.

2.3.4.5.1 Polímeros Naturais

Os polímeros naturais, ou biopolímeros, são estruturas formadas durante o ciclo de crescimento dos organismos vivos. Geralmente, a sua formação envolve reações enzimáticas ou de crescimento em cadeia a partir de monômeros ativados, que são formados por processos metabólicos dentro das células.^{57,58}

Os biopolímeros podem ser divididos em três classes principais: polinucleotídeos, polipeptídeos e polissacarídeos.^{57,59} A Tabela 1 mostra alguns exemplos dos polímeros que pertencem a cada classe.

Tabela 1. Classificação dos polímeros de fontes naturais em polissacarídeos, polipeptídeos e polinucleotídeos. Adaptado de Yadav e colaboradores.⁶⁰

Polímeros de fontes naturais		
Polissacarídeos	Polipeptídeos	Polinucleotídeos
Ácido hialurônico, quitina, quitosana, dextrano, celulose, agarose, pectina e alginato	Colágeno, gelatina, elastina e fibrina	Ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA)

Polímeros naturais são frequentemente usados em estudos celulares por possuírem natureza química semelhante à MEC. Muitos dos polipeptídeos naturais como colágeno⁶¹ e fibronectina⁶² contém domínios de ligações celulares que permitem adesão celular. Além disso, muitos polissacarídeos de origem natural como alginato⁶³, ácido hialurônico⁶⁴ e quitosana⁶⁵, apresentam estrutura química similar aos glicosaminoglicanos (componentes principais da MEC e dos tecidos conectivos) e, portanto, proporcionam hidrogéis com permeabilidade controlada. Em virtude de suas características têm sido muito estudados como *scaffolds* celulares tridimensionais.⁶⁶

Apesar da excelente biocompatibilidade, os polímeros naturais possuem algumas propriedades desvantajosas quando comparados aos sintéticos.

Primeiramente, as propriedades mecânicas dos hidrogéis fabricados com esse tipo de polímero são dificilmente controladas, prejudicando sua aplicação. Além disso, a degradação desses polímeros não é controlada, prejudicando as propriedades químicas e físicas durante sua aplicação. Por fim, as propriedades dos hidrogéis dependem das fontes derivadas do polímero, diminuindo a reprodutibilidade das propriedades e funções dos materiais.⁶⁶

Os polímeros naturais podem ser quimicamente modificados por conterem variados grupos funcionais facilmente reativos, como aminas e ácidos carboxílicos. Desta forma podem ser facilmente funcionalizados e bioconjugados para melhorar suas propriedades mecânicas e físico-químicas.⁸

2.3.4.5.1.1 Quitosana

A quitina pode ser extraída do exoesqueleto de crustáceos e insetos, encontrando-se também na parede celular de fungos e microrganismos. É o segundo polissacarídeo mais abundante da Terra, atrás apenas da celulose.^{67,68} Em 1823, Odier encontrou uma substância semelhante à celulose enquanto trabalhava com insetos, a qual chamou de quitina que significava, do grego, cobertura ou túnica.^{67,68}

A quitosana foi descoberta por C. Rouget após tratar a quitina com uma solução concentrada de hidróxido de potássio à quente. A esta substância deu o nome de “quitina modificada”, que ao contrário da quitina era solúvel em ácidos orgânicos. O nome quitosana foi dado em 1894 pelo pesquisador Hoppe-Seyler. A transformação da quitina em quitosana é, normalmente, feita por tratamento alcalino. A desacetilação não ocorre de forma completa, sendo possível dissolver a quitosana em soluções ácidas diluídas com um grau de desacetilação de 60 %.⁶⁹

A quitosana é solúvel em soluções ácidas porque ocorre a protonação dos grupos $-NH_2$. Desta forma, quanto maior for o grau de desacetilação, mais grupos $-NH_2$ estarão disponíveis para a protonação em solução. Os estudos da citocompatibilidade da quitosana revelam que a presença dos grupos amina livres promovem a interação entre a quitosana e as células.⁷⁰

A quitosana é constituída de um polissacarídeo catiônico de D-glucosamina (mais de 50 %) e *N*-acetil-D-glucosamina (Figura 12) e é conhecida por ser biocompatível, atóxica, possuir propriedades antibacterianas e biodegradável.⁷¹ Este polímero pode ser obtido através da desacetilação da quitina, e age como um biomaterial biomimético em virtude da estrutura similar aos glicosaminoglicanos, encontrados nos tecidos nativos, como córnea e cartilagens.⁵

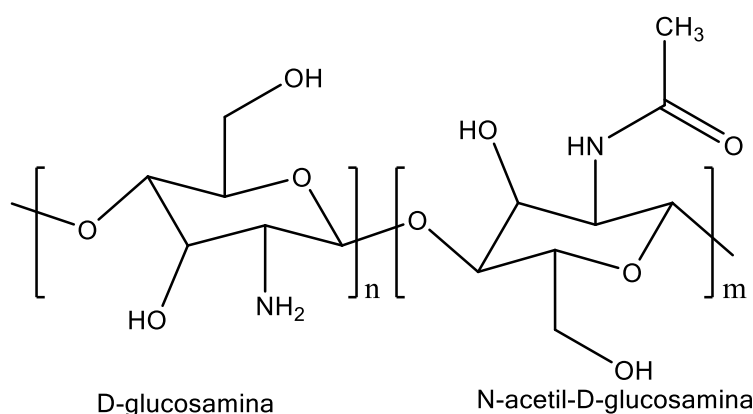


Figura 12. Estrutura molecular do biopolímero quitosana.

O biopolímero quitosana e seus derivados possuem várias aplicações em ET. Um exemplo é a utilização de hidrogéis de quitosana para eliminar espécies reativas de oxigênio, que estão associadas ao infarto do miocárdio. A formação de um hidrogel de quitosana exige alta massa molar ou altas concentrações. Entretanto, a atividade antioxidante da quitosana diminui com o aumento da massa molar, necessitando de um meio auxiliar para manter essa característica.⁵ Li e colaboradores desenvolveram um hidrogel injetável de quitosana com glutathione, ambos com potencial antioxidante, que mostrou ótimo desempenho eliminando espécies reativas de oxigênio intracelular em excesso.⁷²

Modificações químicas na estrutura da quitosana vem sendo estudadas para melhorar as propriedades físico-químicas e a resposta celular. As propriedades mecânicas não são adequadas para suportar as forças no local de implante.⁷³

A quitosana possui alto grau de cristalinidade e propriedades mecânicas rígidas, oriundas das forças inter e intramoleculares extremamente fortes causadas pelos numerosos grupos hidroxila, amina e acetamida presentes em sua estrutura.¹⁴

Pollot e colaboradores⁷⁴ desenvolveram hidrogéis à base de quitosana e colágeno tipo I para aplicação em engenharia de tecidos do esqueleto muscular. Jing e colaboradores⁷⁵ desenvolveram hidrogéis condutores à base de quitosana, GO e PDA. Os hidrogéis alcançaram condutividade elétrica de 1,22 mS cm⁻¹, o que corresponde ao do miocárdio nativo.

2.3.4.6 Polímeros Sintéticos

Polímeros sintéticos vêm sendo muito utilizados em estudos com células em aplicações biomédicas. Eles permitem a obtenção de hidrogéis com arquiteturas e propriedades químicas e mecânicas bem definidas. Polímeros sintéticos como o polietilenoglicol (PEG)⁷⁶, a poli(acrilamida) (PAAm)⁷⁷, o poli(ácido acrílico) (PAA)⁷⁸, o poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (pHEMA)⁷⁹, o poli(álcool vinílico) (PVA)⁸⁰, o poli(ácido glicólico) (PGA)⁸¹, o poli(ácido láctico) (PLA)⁸² e a poli(*N*-isopropil acrilamida) (PNiPAAm)⁸³, são amplamente utilizados para a obtenção de hidrogéis.⁶⁶ Dentre os citados, o PEG se caracteriza por possuir baixa toxicidade e imunogenicidade e, em razão disso, é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para a utilização em materiais que estejam em contato com o corpo humano.⁸⁴ Além disso, é amplamente utilizado na fabricação de *scaffolds* tridimensionais por permitir modificações químicas com vários grupos funcionais em sua estrutura, incluindo grupos reticulantes e unidades biodegradáveis.⁶⁶

Os hidrogéis constituídos de PEG têm sido muito estudados como *scaffolds* na ET devido as suas propriedades mecânicas, porosidade e biocompatibilidade. No entanto, eles não possuem sítios de fixação celular e não são biodegradáveis, pois o organismo consegue eliminar o PEG até massas molares de 30.000 g mol⁻¹.⁵

Modificações químicas e formação de conjugados são abordagens utilizadas para aprimorar a interação do hidrogel de PEG com o meio biológico. Alguns estudos funcionalizaram PEG com biomoléculas afim de obter locais propícios para adesão celular. A facilidade de modificações químicas na cadeia do PEG é uma vantagem valiosa na formação de *scaffolds* biológicos, permitindo aperfeiçoar propriedades mecânicas e biológicas. Além disso, hidrogéis conjugados de PEG contendo alginato⁸⁵, quitosana⁸⁶, gelatina⁸⁷, colágeno⁸⁸, MEC⁸⁹, entre outros apresentam propriedades biológicas, químicas e físicas muito atraentes para a ET.⁵

2.4 Derivados de grafite

Alótropos de carbono são materiais naturais com variações na ligação covalente entre os átomos de carbono. O arranjo espacial adotado pelos átomos de carbono de cada um desses materiais leva a propriedades físicas e químicas distintas. O grafite é um dos alótropos de carbono e sua estrutura é formada pelo empilhamento de múltiplas folhas de átomos de carbono dispostos em uma rede hexagonal, de espessura de um átomo.⁹⁰

As camadas que constituem o grafite são chamadas de grafeno, o material mais fino conhecido e consiste em uma estrutura de cristais bidimensionais. Ele foi descoberto em 2004 por Geim e colaboradores, os quais receberam o Prêmio Nobel de Física por sua descoberta. Antes disso, a existência de materiais cristalinos bidimensionais e atômica e finos era considerada impossível fisicamente.^{90,91} Desde sua descoberta, os estudos sobre suas aplicações têm crescido exponencialmente, abrangendo áreas como dispositivos eletrônicos e optoeletrônicos, materiais fotocondutores em células solares, sistemas de liberação controlada de fármacos e ET.⁹¹

As propriedades únicas do grafeno o tornam uma grande adição a família dos materiais à base de carbono. Possui excelentes propriedades mecânicas, físico-químicas, térmicas, eletrônicas, óticas e biomédicas que são consequência de uma estrutura formada por fortes ligações C-C no plano, estrutura aromática e elétrons π livres. Além disso, possui características interessantes para diversas aplicações como alta condutividade térmica, alta

movilidade de cargas, grande área superficial teórica e excelentes propriedades mecânicas.⁹¹

O grafeno possui uma estrutura formada por uma camada bidimensional de espessura atômica, semelhante a um favo de mel. Possui ligações sigma com cada átomo de carbono tendo elétrons π livres, contribuindo para uma rede deslocalizada de elétrons. A estrutura plana permite participação em diversas reações, que transformam a estrutura sp^2 em sp^3 , levando a formação de defeitos topológicos, vacâncias, bordas ou impurezas absorvidas na estrutura. Os elétrons π livres fornecem uma alta densidade eletrônica abaixo e acima do plano 2D e interagem facilmente com orbitais moleculares de fronteira de variados compostos orgânicos.⁹¹⁻⁹³

Grafeno e seu derivados, como óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO), têm sido muito estudados como componentes de biomateriais em virtude de suas ótimas características elétricas e mecânicas e por serem citocompatíveis.⁹⁴

O grafeno é naturalmente hidrofóbico e sua solubilização em água requer a utilização de surfactantes ou agentes estabilizantes. O óxido de grafeno (GO) é geralmente produzido pela exfoliação oxidativa do grafite. Ele possui baixa condutividade elétrica, devido aos defeitos de sua estrutura molecular, e é altamente solúvel em água, capaz de formar ligações hidrogênio. Por outro lado, o óxido de grafeno reduzido (rGO) é condutor e pouco solúvel, contém defeitos de vacâncias basais que ocorrem durante a remoção do oxigênio, tornando-o menos hidrofóbico que o grafeno. As estruturas químicas do grafeno, óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido estão mostradas na Figura 13.^{91,94}

A oxidação do grafite solta suas folhas de grafeno devido à introdução aleatória de grupos funcionais de oxigênio (carbonilas, hidroxilas, fenol e epóxidos), tanto na superfície plana quanto nas bordas. A oxidação em meio ácido do grafite, que leva à formação do óxido de grafite, foi descrita pela primeira vez há mais de 150 anos por Brodie e colaboradores.⁹⁵ No entanto, o método mais utilizado é baseado na técnica introduzida por Hummers e Offeman⁹⁶, que utiliza permanganato de potássio e ácido sulfúrico concentrado

na oxidação do grafite, esse princípio é mais comumente conhecido como método de Hummers. O óxido de grafeno mostra vantagens em aplicações biomédicas por suas dispersidade em água mais confiável e maior estabilidade.^{90,93}

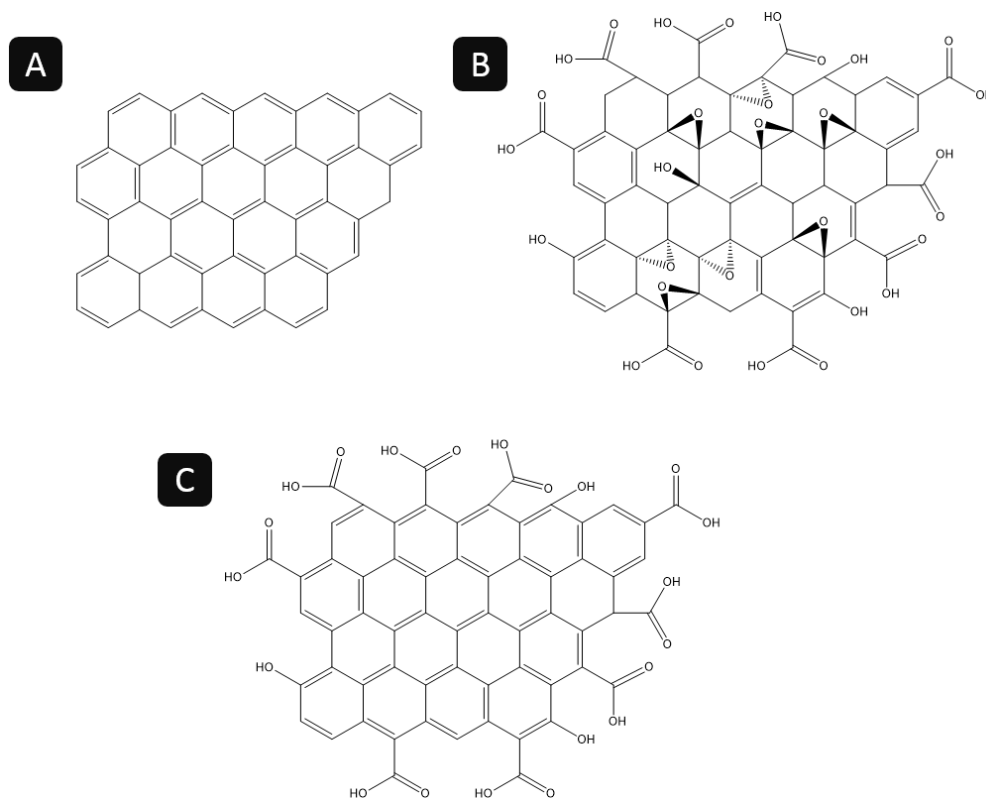


Figura 13. Estrutura química do grafeno (A), óxido de grafeno (B) e óxido de grafeno reduzido (C).

A redução do óxido de grafeno ocorre pela redução dos grupos funcionais oriundos do processo de oxidação. Essa redução pode ocorrer parcial ou completamente. Os tratamentos mais comumente utilizados envolvem hidrazina ou diazeno, que são altamente tóxicos e podem ser prejudiciais para fins de aplicação biomédica.⁹⁷ O processo de redução do GO é importante para recuperar a rede conjugada e a condutividade elétrica.⁹⁸

Nos últimos anos, métodos de química “verde” têm sido estudados para a redução do GO através de rotas hidrotermais utilizando biomoléculas como gelatina, glicose, quitosana, ácido ascórbico e albumina. O processo é desenvolvido com aquecimento e o agente redutor biocompatível é conjugado na superfície do grafeno, melhorando a biocompatibilidade. A reação da

redução do óxido de grafeno com a quitosana, por exemplo, está apresentada na Figura 14, onde pode ser observado como ocorre a interação entre o biopolímero e o GO.^{92,97}

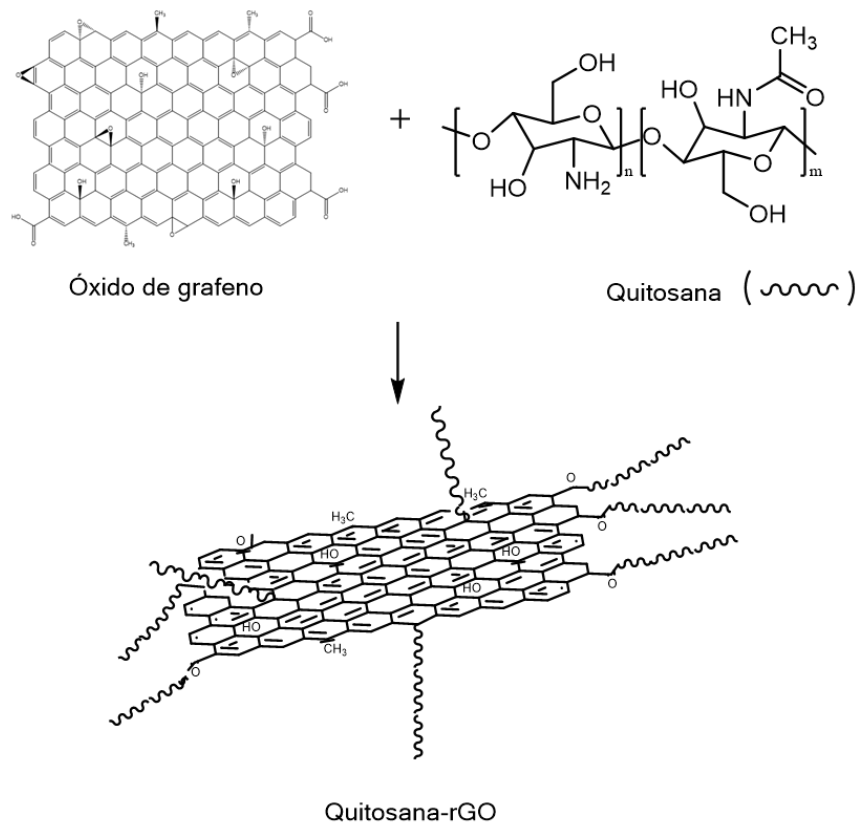


Figura 14. Esquema da reação de redução do óxido de grafeno utilizando o biopolímero quitosana como agente redutor.

Hidrogéis condutores de derivados de grafeno possuem várias propriedades vantajosas, como aumento da estabilidade mecânica e elétrica, em virtude da interação dos derivados de grafeno com a cadeia polimérica e de não precisarem de dopantes para conduzir eletricidade.^{91,94}

Jing e colaboradores desenvolveram hidrogéis de quitosana e dopamina com óxido de grafeno reduzido. Os hidrogéis mostraram aumento de condutividade elétrica com o aumento da quantidade de óxido de grafeno. Alguns dos hidrogéis mostraram condutividade dentro da faixa observada para tecido muscular cardíaco (1-4 mS cm⁻¹).⁷⁵

Jo e colaboradores desenvolveram hidrogéis condutores de poliácridamida e óxido de grafeno reduzido. A redução do óxido de grafeno foi

realizada com tratamento em L-ácido ascórbico e os hidrogéis apresentaram condutividades de $0,1 \text{ S cm}^{-1}$.⁹⁹

2.5 Condutividade de biomateriais

As interações entre material e célula envolvem sinais biológicos, químicos, elétricos e mecânicos, sendo importante o desenvolvimento de um biomaterial que possa fazer todas essas interações entre a matriz e a célula.⁹⁴ Em particular, sinais elétricos possuem um papel relevante na comunicação e no comportamento celular. Isso tem encorajado o desenvolvimento de biomateriais condutores de modo a colaborar com a transmissão desses sinais elétricos entre as células. Por exemplo, estímulo elétrico via biomateriais condutores pode aprimorar o crescimento e a diferenciação celular, como neurônios, cardiomiócitos, mioblastos e células-tronco.⁹⁴ Além de estímulos elétricos, *scaffolds* condutores apresentam melhora na adesão, proliferação e diferenciação celular e são muito úteis na cicatrização de feridas e regeneração de tecidos. Em virtude disso, *scaffolds* condutores vêm sendo estudados para aplicações biomédicas com restrições, uma vez que esse tipo de material não é biodegradável.¹¹

A estimulação elétrica pode melhorar o crescimento de células eletro-responsivas, como células nervosas e musculares, por esse motivo a condutividade elétrica é uma característica requerida. A introdução de um “aditivo” eletricamente condutor em uma matriz polimérica pode, não apenas produzir *scaffolds* condutores de eletricidade, mas também melhorar a resistência à tração.¹⁰⁰

2.6 Análises reológicas

Reologia é o estudo da deformação dos materiais diante uma força aplicada. Os princípios da reologia são baseados em teorias que descrevem materiais ideais. Os materiais reais não se comportam como sólidos ou líquidos

ideais. Eles exibem respostas elásticas e viscosas e, portanto, são chamados viscoelásticos.¹⁰¹

A complexidade da estrutura interna dos materiais leva a respostas mecânicas que não são simplesmente definidas por constantes elásticas e viscosas. As respostas dos materiais envolvem a relação entre tensão e deformação, que é dada em função do tempo, direção e extensão da deformação. Os experimentos reológicos têm como objetivo relacionar as propriedades viscoelásticas com a estrutura do material.¹⁰¹

As duas grandezas de maior interesse na reologia são a tensão, quantidade de força por unidade de área aplicada à amostra, e a deformação, o grau de dimensão que o material varia. A caracterização completa das propriedades dos materiais é realizada através da relação entre a tensão e a deformação por medidas de ampla faixa de deformação, taxas de deformação ou escalas de tempo. A propriedade dos materiais é quantificada como módulo de elasticidade para sólidos e viscosidade para líquidos.¹⁰¹

Através de análises reológicas é possível determinar as propriedades viscoelásticas dos materiais, por testes estáticos ou dinâmicos. Utilizando teste dinâmico, podem ser determinadas as propriedades viscoelásticas módulo de perda ou de viscosidade (G'') e o módulo de armazenamento ou de elasticidade (G').¹⁰² No módulo de perda (G''), a energia que é utilizada para que o escoamento ocorra é perdida de forma definitiva em calor de cisalhamento. Já no módulo de armazenamento (G'), a energia de tensão permanece temporariamente armazenada durante a análise.¹⁰³

Uma solução concentrada apresenta comportamento elástico ($G' > G''$) em frequências altas e comportamento viscoso ($G'' > G'$) em frequências baixas. O cruzamento entre G' e G'' é o ponto de transição entre o comportamento elástico e o viscoso. Durante o comportamento elástico, em altas frequências, o período de oscilação é muito curto e não permite a separação das cadeias. Elas se comportam como uma rede reticulada na qual a acomodação do estresse é realizada por deformação da rede. Durante o comportamento viscoso, em baixas frequências, o período de oscilação é suficiente para que as cadeias recuperem a configuração de equilíbrio.^{38,50}

O comportamento reológico dos géis inclui propriedades viscosas e elástica, geralmente apresentam o módulo de armazenamento (G') superior ao módulo de perda (G''). Quanto mais altos os valores de módulo de armazenamento, mais próximo ele estará das características de um sólido e as deformações serão recuperáveis.^{104,105}

Os módulos de armazenamento e de perda fornecem informações sobre os comportamentos de resposta elástica e viscosa de um hidrogel, respectivamente, em resposta ao cisalhamento oscilatório. Em particular, eles medem o quanto um hidrogel é capaz de responder a tensão, absorver energia (módulo de armazenamento) ou sofrer relaxamento da tensão, dissipar energia (módulo de perda).¹⁰¹

3. Objetivo

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi o desenvolvimento de hidrogéis à base de quitosana-óxido de grafeno reduzido e poli(etilenoglicol)-dimetacrilato para potencial aplicação na regeneração de tecidos musculares.

3.2 Objetivos Específicos

1. Sintetizar do óxido de grafeno (GO) a partir do grafite;
2. Sintetizar e caracterizar quitosana-óxido de grafeno reduzido (CS-rGO) contendo quantidades variadas de óxido de grafeno;
3. Funcionalizar e caracterizar o poli(etilenoglicol) contendo grupos metacrilatos (PEG-MA);
4. Preparar hidrogéis utilizando CS-rGO e PEG-MA;
5. Caracterizar os hidrogéis.

4. Materiais e métodos

4.1 Materiais

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais: poli(etilenoglicol) (massa molar: 4.600 g mol^{-1}), anidrido metacrílico, quitosana (grau de desacetilação entre 75-85%, massa molar: $190.000\text{-}310.000 \text{ g mol}^{-1}$) e *N,N,N',N'*-tetrametiletlenodiamina (TEMED), os quais foram adquiridos da Sigma-Aldrich e usados como recebidos. Trietilamina foi adquirida da Vetec, bissulfato de sódio da empresa Nuclear, persulfato de amônio adquirido da Acros Organics e persulfato de potássio adquirido da Neon.

O grafite utilizado neste trabalho para preparar o óxido de grafeno foi gentilmente doado pela companhia brasileira Nacional de Grafite LTDA.

Ainda foram utilizados ácido sulfúrico, ácido acético, hexano, tetrahidrofurano, diclorometano, permanganato de potássio prata de diferentes fornecedores locais. Todos estes reagentes foram utilizados como recebidos. As membranas de diálise de celulose com massa molecular de corte de 12000 Daltons foram adquiridas da Sigma-Aldrich.

4.2 Metodologia

4.2.1 Síntese do PEG com grupos reticuláveis (PEG-MA)

A funcionalização do PEG é necessária para que haja a formação dos hidrogéis através da reticulação cruzada a partir de grupos acrilato ou metacrilato. Assim, para esta funcionalização, o PEG foi solubilizado em diclorometano anidro, sob atmosfera inerte, seguido da adição de anidrido metacrílico (3 eq.) e trietilamina (3 eq.). A reação foi realizada por 4 dias à temperatura ambiente e agitação constante.¹⁰⁶ Após este período, o diclorometano foi evaporado em evaporador rotatório e o produto

remanescente foi solubilizado em tetraidrofurano e precipitado em hexano (2x). O sólido obtido foi seco sob vácuo por 16 horas, e o rendimento foi de 85%.

4.2.2 Síntese de óxido de grafeno

A síntese do óxido de grafeno foi realizada a partir do grafite utilizando o método de Hummer.¹⁰⁷ Para isso 0,5 g de grafite foi pesado juntamente com 3 g de KMnO_4 , e uma mistura de 9:1 $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ (65 mL) foi adicionada, lentamente, sobre os reagentes. A adição da solução ácida foi realizada em banho de gelo, por ser exotérmica. Ao final da adição, a reação foi realizada por 12 horas a 50 °C.

Ao final da reação, 70 mL de água deionizada gelada e 0,5 mL de H_2O_2 (30 %) foram adicionados. Após a adição o produto foi filtrado em peneira de 40 *mesh* e centrifugado a 4500 rpm por 1 hora. O sobrenadante foi descartado e o sólido remanescente foi lavado sucessivamente com água destilada, ácido clorídrico 30 % e etanol (2 vezes). Entre cada uma dessas etapas foi realizada a centrifugação do líquido para a remoção de sólidos remanescentes. Por fim, utilizou-se éter etílico como coagulante e o produto sólido foi filtrado em funil de Buchner e seco sob vácuo à temperatura ambiente. O rendimento da reação foi de 80%.

4.2.3 Síntese de quitosana-óxido de grafeno reduzido (CS-rGO)

Primeiramente, uma solução de quitosana foi preparada com concentração de 1% m/v em solução aquosa de ácido acético 3 % v/v. Uma segunda solução de 0,005% m/v de óxido de grafeno em água foi preparada, a qual foi dispersada em ultrassonicador por 5 minutos (30 % de amplitude, com pulsos de 5 segundos).

Volumes iguais dessas soluções foram misturados e levados ao ultrassom de ponteira por 5 minutos (30 % de amplitude com pulsos de 5 segundos). Em seguida, a mistura foi aquecida a 90 °C por 12 horas para a redução do óxido de grafeno e formação do complexo CS-rGO. Ao final do

tempo de reação, a coloração da solução se alterou de marrom para preta, como mostrado na Figura 15. A solução final foi dialisada em água deionizada por 4 dias a fim de eliminar o ácido acético e manter o pH 7,0. A solução foi borbulhada com gás inerte e guardada em ambiente refrigerado.¹⁰⁸ A Tabela 2 apresenta as proporções dos reagentes utilizados nas reações de quitosana-óxido de grafeno reduzido. A concentração de quitosana utilizada para todas as reações foi de 0,5% m/v, enquanto a concentração de óxido de grafeno variou de 0,0025% a 0,01% m/v.

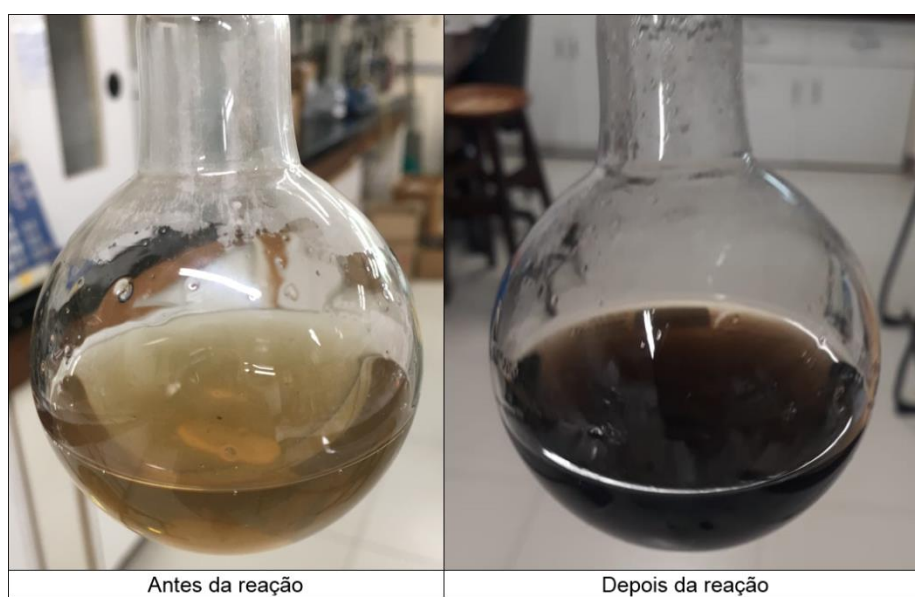


Figura 15. Foto da solução da quitosana-óxido de grafeno reduzido antes e depois da reação de redução.

Tabela 2. Descrição das proporções dos reagentes da síntese de quitosana-óxido de grafeno reduzido (CS-rGO).

CS (% m/v)	GO (% m/v)
0,5	0,0025
	0,005
	0,01
	0,5

4.2.4 Preparação de hidrogéis

Os hidrogéis foram preparados a partir de soluções contendo os polímeros. Primeiramente, o PEG-MA foi pesado em balão volumétrico. A

solubilização do PEG-MA foi realizada de três maneiras diferentes. A solução utilizada para formação do hidrogel contendo PEG-MA puro foi preparada com água deionizada. A solução utilizada para formação do hidrogel contendo PEG-MA + CS pura foi realizada através da solubilização do PEG-MA com uma solução previamente preparada de CS pura em solução de ácido acético 3% v/v, já dialisada. As soluções utilizadas para formação do hidrogel contendo PEG-MA + CS-rGO foram preparadas através da solubilização do PEG-MA com soluções de CS-rGO em água deionizada. Essas soluções de CS-rGO são oriundas da reação de redução do óxido de grafeno com a quitosana, portanto, possuem a mesma concentração utilizada na reação de redução. Todas as soluções foram dialisadas até pH 7,0 antes de serem utilizadas para a preparação das soluções dos hidrogéis. Os hidrogéis foram preparados em placas de poliestireno contendo 24 poços, a partir da adição de 1 mL das soluções. A reação de reticulação ocorreu pela adição do sistema iniciador, composto pelo ativador bissulfito de sódio (SBS - NaHSO₃) ou *N,N,N',N'*-tetrametiletilenodiamina (TEMED), juntamente com o iniciador persulfato de potássio (PPS - K₂S₂O₈) ou amônio (APS - (NH₄)₂S₂O₈), todos com concentração final de 10 mmol L⁻¹. O tempo de reação foi estabelecido em 30 minutos, à temperatura ambiente. Após esse tempo o hidrogel foi colocado em água tipo Mili-Q em um tubo falcon para a remoção dos subprodutos remanescentes da reação de reticulação. Todos os hidrogéis foram preparados em triplicatas para cada análise.

4.2.4.1 Preparação de hidrogéis com diferentes proporções de GO

Os hidrogéis foram preparados a partir de soluções contendo 10 % (m/v) PEG-MA e 0,5 % (m/v) CS-rGO, com diferentes quantidades de óxido de grafeno. A Tabela 3 mostra as composições dos hidrogéis estudados e os sistemas de iniciadores utilizados.

Tabela 3. Composição dos hidrogéis com diferentes proporções de óxido de grafeno e sistemas de iniciadores utilizados.

PEG-MA (% m/v)	CS (% m/v)	GO (% m/v)	Sistema de iniciadores		
			APS+SBS	APS+TEMED	APS+TEMED
10	0	0	X	X	X
	0,5	0	-	-	X
	0,5	0,0025	X	X	X
	0,5	0,005	X	X	X
	0,5	0,01	X	X	X

4.2.4.2 Preparação de hidrogéis com diferentes proporções de PEG

Hidrogéis contendo diferentes quantidades de PEG-MA foram preparados. As quantidades de quitosana e óxido de grafeno foram fixadas. O sistema de iniciadores utilizado foi PPS e TEMED. A Tabela 4 mostra a composição dos hidrogéis preparados.

Tabela 4. Composição dos hidrogéis contendo diferentes quantidades de PEG-MA.

PEG-MA (% m/v)	CS (% m/v)	GO (% m/v)
5		
10	0,5	0,01
20		

4.2.4.3 Preparação de hidrogéis com diferentes proporções de CS

Hidrogéis contendo diferentes concentrações de quitosana, com e sem óxido de grafeno reduzido, foram preparados. O sistema de iniciadores utilizado foi PPS e TEMED. A Tabela 5 mostra as proporções dos hidrogéis preparados.

Tabela 5. Composição dos hidrogéis preparados com diferentes proporções de quitosana.

PEG-MA (% m/v)	CS (% m/v)	GO (% m/v)
10	0,5	0
	1	0
	2	0
	0,5	0,01
	1	0,01
	2	0,01

4.2.4.4 Hidrogéis com 0,5% CS-rGO 0,5% GO

O procedimento utilizado para a síntese da CS-rGO com 0,5% CS e 0,5% GO foi o 4.2.3. A solução de CS foi preparada com concentração 1% m/v em solução de ácido acético 3% v/v e a solução de GO foi preparada com concentração de 1% m/v em água deionizada.^{97,108}

Os hidrogéis foram preparados a partir da solução contendo 10 % de PEG-MA, 0,5 % de CS-rGO com proporção de 1:1 entre CS e GO. A solução foi preparada pesando o PEG-MA em balão volumétrico e completando o volume com solução de CS-rGO 1:1. O sistema de iniciadores utilizando foi PPS e TEMED (10 mmol.L⁻¹ no hidrogel).

4.3 Caracterizações

4.3.1 Caracterização do PEG-MA

4.3.1.1 RMN de ¹H

A funcionalização do PEG com anidrido metacrílico foi caracterizada através de análises de RMN de ¹H. Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos a 400 MHz, em tubos de quartzo de 5 mm de diâmetro interno, utilizando o espectrômetro Bio Spin GmbH (*Bruker*). Os deslocamentos químicos (δ) estão

relacionados em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno. As amostras foram preparadas solubilizando 20 mg do polímero em 0,75 mL de CDCl_3 .

4.3.2 *Caracterização do GO e CS-rGO*

4.3.2.1 *Difração de raio X (DRX)*

A caracterização do óxido de grafeno e da CS-rGO foi realizada através de difração de raio X. Os difratogramas foram obtidos em um equipamento Siemens D-500. Os dados foram obtidos com radiação $K\alpha$ de Cu, com comprimento de onda de 0,15418 nm, com varredura angular de 20° para 90° (2θ). As amostras foram liofilizadas e maceradas para a realização da análise.

4.3.2.2 *Espectroscopia no UV-Visível*

A caracterização óptica do óxido de grafeno e da CS-rGO foi realizada pela obtenção de espectros de absorção em um espectrofotômetro UV-Visível Shimadzu UV-2450 com varredura do espectro entre 200 e 650 nm.

4.3.3 *Caracterização dos hidrogéis*

Os hidrogéis foram caracterizados por análises de grau de intumescimento, compressão (DMA), análises reológicas, condutividade, análise termogravimétrica (TGA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.3.3.1 *Grau de intumescimento*

O grau de intumescimento foi utilizado para avaliar a quantidade de água que os hidrogéis são capazes de absorver. Para isso, os hidrogéis secos foram pesados e colocados em 5 mL de uma solução tampão fosfato (pH 7,4). O intumescimento dos hidrogéis foi determinado através da pesagem

das amostras inchadas em diferentes tempos, retirando-se o excesso de água utilizando um papel filtro.¹⁰⁹ As análises foram realizadas em triplicata, a 25°C, onde foram determinados o percentual de água absorvida (W) e o grau de intumescimento (Q) dos hidrogéis segundo as equações abaixo:

$$W = \left(\frac{M_t}{M_s} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$Q = \left[\frac{(M_t - M_s)}{M_t} \right] \times 100 \quad (2)$$

W = Percentual de água absorvida

Q = Grau de intumescimento

Mt = Massa do hidrogel intumescido

Ms = Massa do hidrogel seco

4.3.3.2 Análises reológicas

Os hidrogéis foram analisados através de análises reológicas de oscilação da amplitude de deformação, da frequência e do tempo. A análise de oscilação da amplitude foi realizada a fim de determinar a faixa de viscoelasticidade linear do hidrogel. A análise de oscilação da frequência foi realizada para determinar o módulo de elasticidade, utilizando parâmetros determinados a partir da análise de oscilação da amplitude. A análise de oscilação do tempo foi realizada para estudar a cinética da reação de formação do hidrogel. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os hidrogéis foram formados no equipamento com diâmetro de 25 mm.³⁷ Os testes foram realizados no Laboratório Mutiusuário de Análises Térmicas (LAMAT) em um reômetro *TA Instruments* modelo ARES-G2 a 37°C, utilizando a geometria de placas paralelas com camisa de solvente.

4.3.3.3 Condutividade elétrica

As amostras foram submetidas à análise de sua condutividade através do sistema de quatro pontas, utilizando-se o eletrômetro modelo 2410, Keithley Instruments conjugado com o sistema de quatro pontas no Laboratório de Catálise Molecular (LAMOCA). As medidas de condutividade foram realizadas em triplicata de 0 a 5 V com 50 ms de retardamento, a 20°C. A partir da análise, o programa do eletrômetro gera um gráfico de V x I.¹¹⁰ A condutividade foi obtida utilizando o coeficiente angular da reta I x V, através do cálculo:

$$\sigma = \frac{1}{\frac{\pi}{\ln 2} \times \alpha \times t} \quad (3)$$

σ = condutividade elétrica (S.cm⁻¹)

α = coeficiente angular da reta I (Ampère) x V (Volt)

t = espessura do material

4.3.3.4 Análise termogravimétrica (TGA)

Os termogramas de TGA foram obtidos em um analisador térmico modelo Q50 (TA Instruments). As análises foram realizadas na sala de equipamentos 201 do prédio 43161. Para cada análise, cerca de 5 mg de amostra foram colocados em um porta amostras de platina e submetidas a um aquecimento de 30 °C a 700 °C, empregando uma taxa de aquecimento de 20 °C e sob atmosfera inerte.

4.3.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é utilizada para fornecer informações sobre a topografia da superfície da amostra, tais como a presença ou não de poros.

Os hidrogéis foram liofilizados e fraturados com a utilização de nitrogênio líquido. As amostras foram recobertas com ouro e as micrografias foram registradas utilizando microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6060 do Centro de Microscopia e Microanálise (CMM-UFRGS).

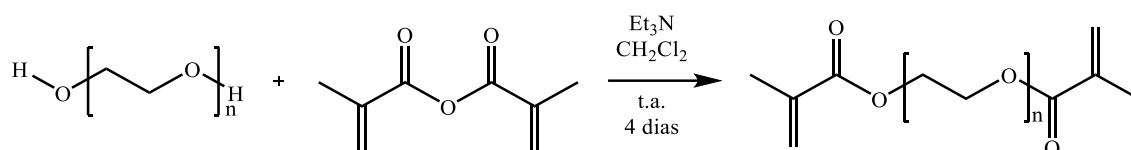
4.3.3.6 Análise estatística

Os resultados obtidos para os testes reológicos, de condutividade e grau de intumescimento foram representados através de médias e desvio padrão das análises, as quais foram avaliadas por ANOVA (One Way) e como pósteste foi utilizado o teste de Tukey. Para critérios de decisão foi utilizado o nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). Os resultados foram gerados pelo programa PAST.

5. Resultados e Discussão

5.1 Funcionalização do PEG

O polietilenoglicol foi funcionalizado com anidrido metacrílico para a obtenção de grupos reticuláveis nas extremidades da cadeia polimérica (Esquema 1). Assim, a formação do hidrogel se dará pela reação entre os grupos reticuláveis inseridos.



Esquema 1. Reação de funcionalização do PEG com anidrido metacrílico.

A comprovação da funcionalização das cadeias do PEG foi realizada através da análise de RMN de ¹H, cujo espectro está mostrado na Figura 16. Os hidrogênios ligados ao carbono vinílico do grupo metacrilato aparecem como singletos em 5,6 e 6,2 ppm. Para determinar a eficiência da funcionalização, as integrais dos hidrogênios da ligação dupla do metacrilato foram comparadas à integral do sinal em 4,3 ppm, referente aos hidrogênios dos dois -CH₂ terminais do PEG. A razão encontrada entre estas integrais resultou em um valor de aproximadamente 0,5 de acordo com a Equação 4, comprovando o êxito da reação.

$$\frac{I_{Hdupla}}{I_{4,3ppm}} = \frac{2}{4} = 0,50 \quad (4)$$

A razão entre as integrais do sinal em 3,7 ppm, referente aos hidrogênios dos -CH₂ da unidade repetitiva do PEG, e dos sinais dos hidrogênios da ligação dupla do metacrilato, também foi avaliada. A razão encontrada entre estas integrais resultou em um valor de aproximadamente 209 de acordo com a Equação 5, comprovando o êxito da reação.

$$\frac{I_{3,7ppm}}{I_{Hdupla}} = \frac{418}{2} = 209 \quad (5)$$

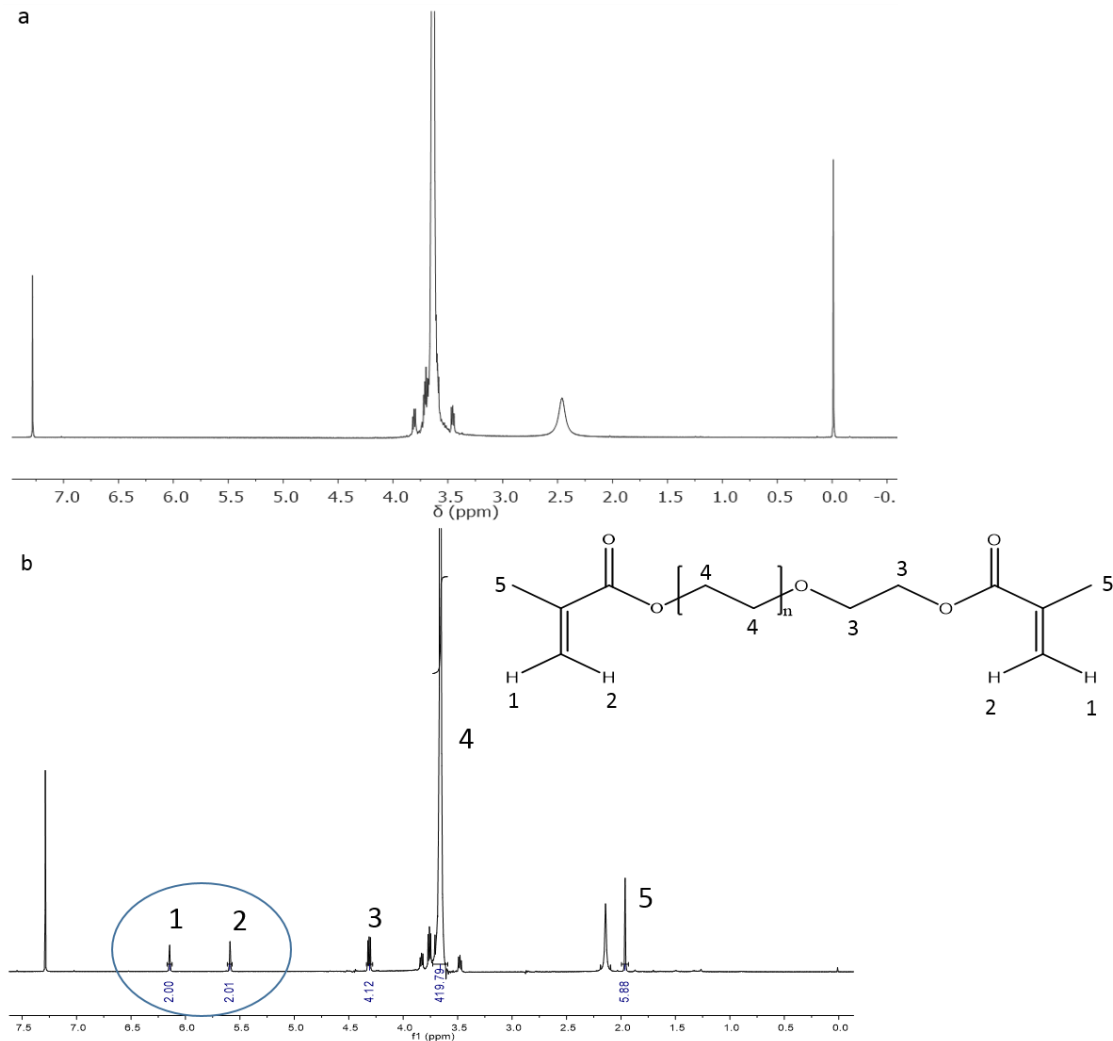


Figura 16. Espectro de RMN de ¹H do PEG antes (a) e depois da funcionalização com anidrido metacrílico (b) em CDCl₃.

5.2 Síntese do óxido de grafeno e da quitosana-óxido de grafeno reduzido

A caracterização do óxido de grafeno e da quitosana-óxido de grafeno reduzido foi realizada através de difração de raio X (DRX) para observar os planos cristalográficos correspondentes ao grafite, óxido de grafeno e óxido de

grafeno reduzido. A Figura 17 apresenta os difratogramas do grafite utilizado como material de partida, do óxido de grafeno (GO) sintetizado, da quitosana pura (CS) e da quitosana funcionalizada com óxido de grafeno reduzido (CS-rGO). Um pico intenso é observado no difratograma do grafite em $2\theta = 26,5^\circ$. Nos difratogramas também é possível observar que o pico de óxido de grafeno ($2\theta = 9,75^\circ$) diminui após a reação de redução. O padrão de DRX para a quitosana apresenta duas bandas de difração em $2\theta = 9,05^\circ$ e $19,8^\circ$, mostrando a existência de estrutura cristalina e amorfa. Já na amostra CS-rGO ocorre o surgimento de um pico em $2\theta = 21,75^\circ$ e é possível observar que a estrutura cristalina da quitosana foi modificada, já que houve alteração nos picos característicos da CS pura.

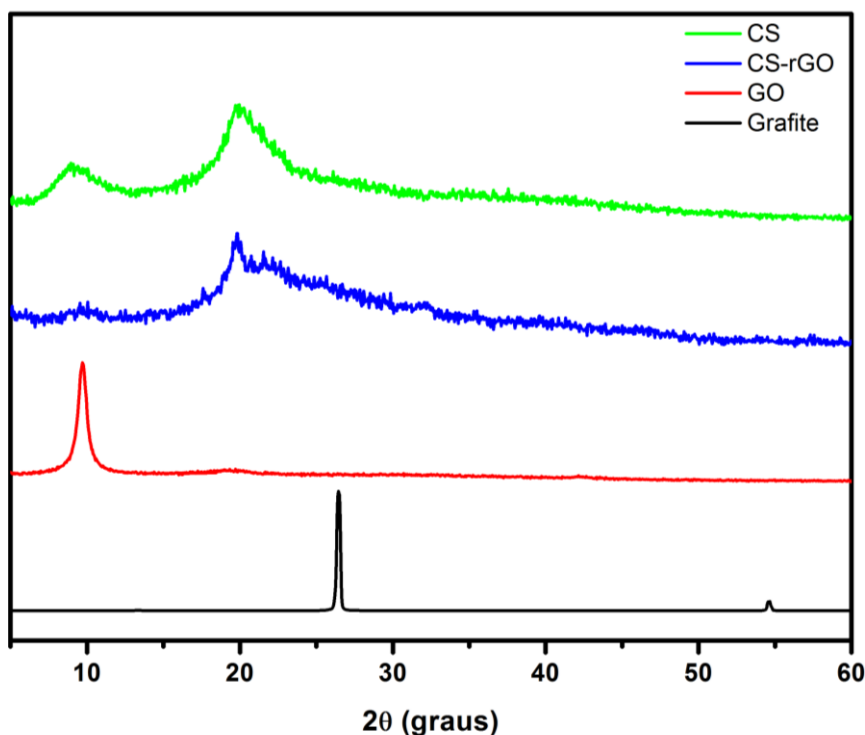


Figura 17. Difratogramas de raio X do grafite, do óxido de grafeno sintetizado (GO), da quitosana pura (CS) e da quitosana-óxido de grafeno reduzido (CS-rGO).

A Figura 18 apresenta o espectro de absorção no UV-Visível para as soluções de óxido de grafeno (GO) e quitosana-óxido de grafeno reduzido (CS-rGO). O óxido de grafeno apresenta duas bandas de absorção a primeira em 224 nm, corresponde às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ das ligações C-C aromáticas, já a

segunda, em 303 nm, corresponde às transições $n \rightarrow \pi^*$ dos grupos carbonílicos. A CS-rGO apresenta um deslocamento na transição $\pi \rightarrow \pi^*$ para 275 nm e o desaparecimento da banda correspondente as transições $n \rightarrow \pi^*$, já que os grupos carbonílicos foram reduzidos, sugerindo a restauração da conjugação eletrônica das folhas de grafeno.

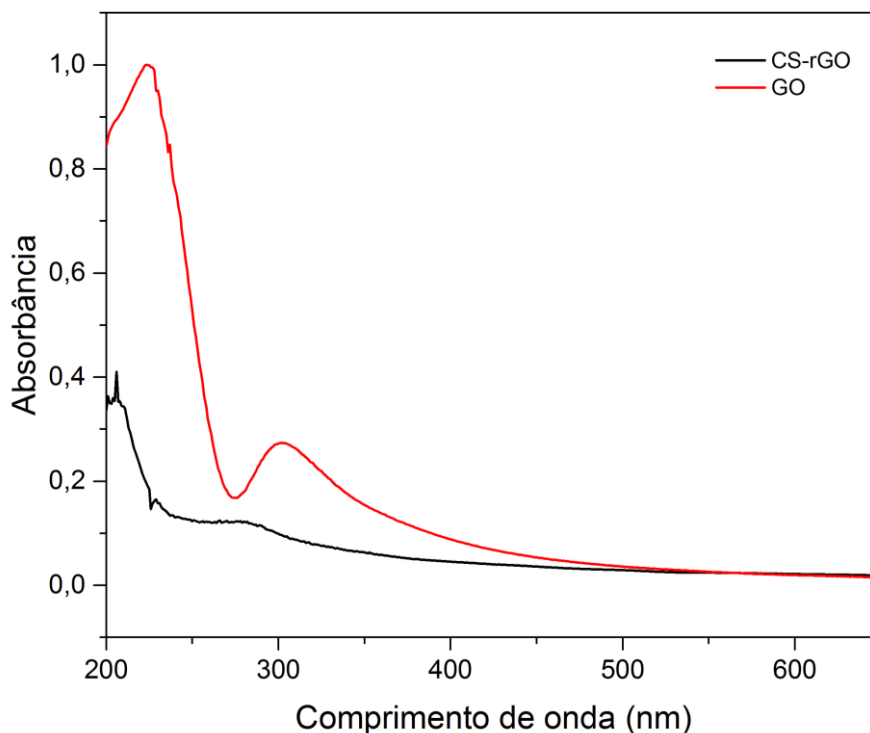


Figura 18. Espectro de absorção no UV-Visível para as soluções de óxido de grafeno (GO) e quitosana-óxido de grafeno reduzido (CS-rGO).

5.3 Preparação e caracterização dos hidrogéis

Todos os hidrogéis formaram uma estrutura rígida e transparente (

Figura 19). Os hidrogéis foram preparados em placas de poços utilizando um sistema de iniciadores para sua formação (Figura 20). A presença do óxido de grafeno reduzido deixa o hidrogel com colocação marrom.

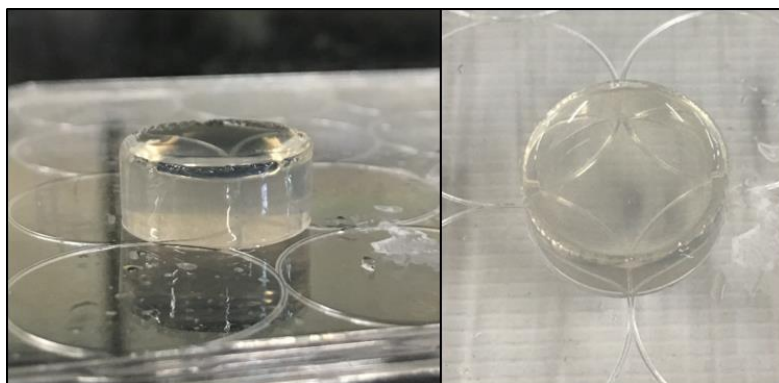


Figura 19. Foto dos hidrogéis contendo 10% PEG-MA.

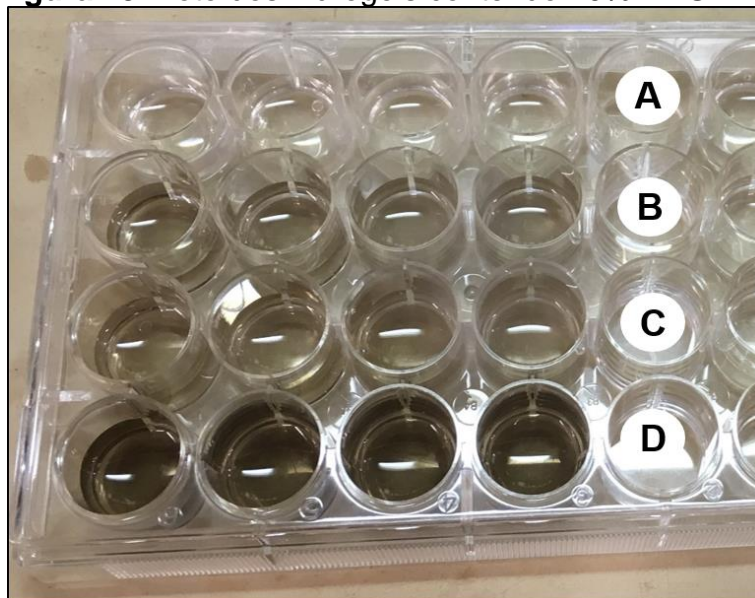


Figura 20. Foto dos hidrogéis preparados na placa de poços contendo PEG-MA (A), PEG-MA + CS-rGO 0,0025% GO (B), PEG-MA + CS-rGO 0,005% GO (C) e PEG-MA + CS-rGO 0,01% GO (D).

5.3.1 Hidrogéis de quitosana com óxido de grafeno reduzido (CS-rGO) (com diferentes concentrações de óxido de grafeno)

5.3.1.1 Grau de intumescimento

O grau de intumescimento (Q) foi avaliado a partir de hidrogéis secos em estufa à vácuo e liofilizador. A análise foi realizada para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA e 0,5 % de quitosana com diferentes quantidades de óxido de grafeno utilizando como sistema de iniciadores: APS e SBS (Figura 21), APS e TEMED (Figura 22) ou PPS e TEMED (Figura 23). A razão para a utilização de diferentes sistemas de iniciação foi investigar se haveria mudanças no grau de

intumescimento e, conseqüentemente, no grau de reticulação, com a mudança do iniciador ou ativador. O hidrogel contendo quitosana pura (10 % PEG-MA + 0,5 % CS) foi obtido apenas com o sistema de iniciação PPS + TEMED, pois nos demais sistemas apresentou precipitação da quitosana. O motivo para esta precipitação pode estar no mesmo efeito observado para a precipitação de proteínas, pois é sabido que sais contendo o contraíon amônio são comumente utilizados para esta finalidade.¹¹¹

Os gráficos do grau de intumescimento para os hidrogéis utilizando o sistema de iniciação APS + SBS é o que apresenta formação mais rápida dos hidrogéis. Além disso, é o que apresenta maior diferença no grau de intumescimento máximo entre as amostras de diferentes composições. O grau de intumescimento nos hidrogéis utilizando TEMED no sistema de iniciação atinge o equilíbrio em, aproximadamente, 600 minutos para todas as variações estudadas.

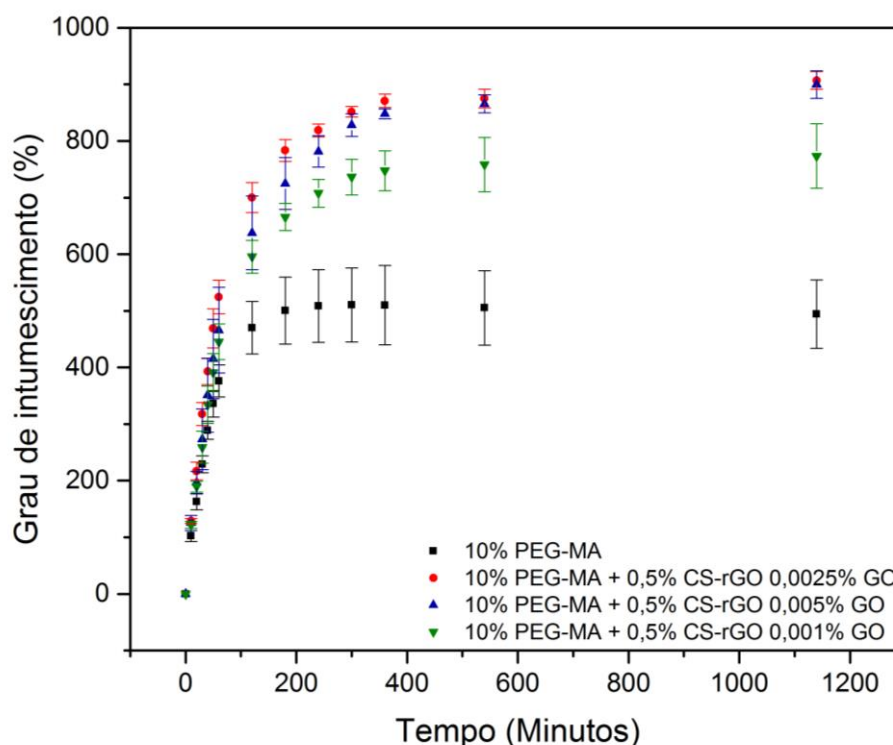


Figura 21. Gráficos do grau de intumescimento em função do tempo para os hidrogéis de 10 % PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores APS e SBS.

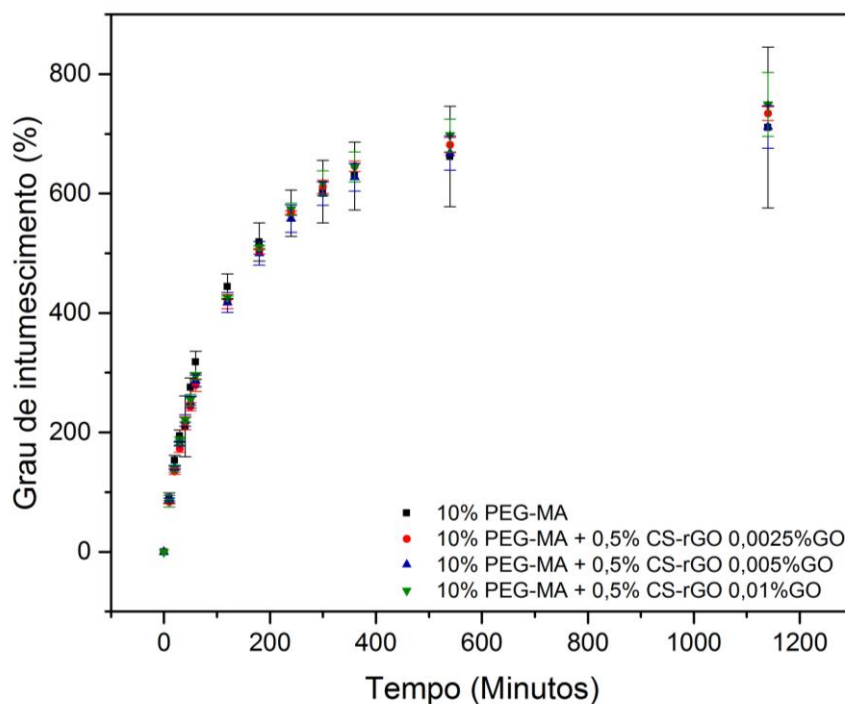


Figura 22. Gráficos do grau de intumescimento em função do tempo para os hidrogéis de 10 % PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores APS e TEMED.

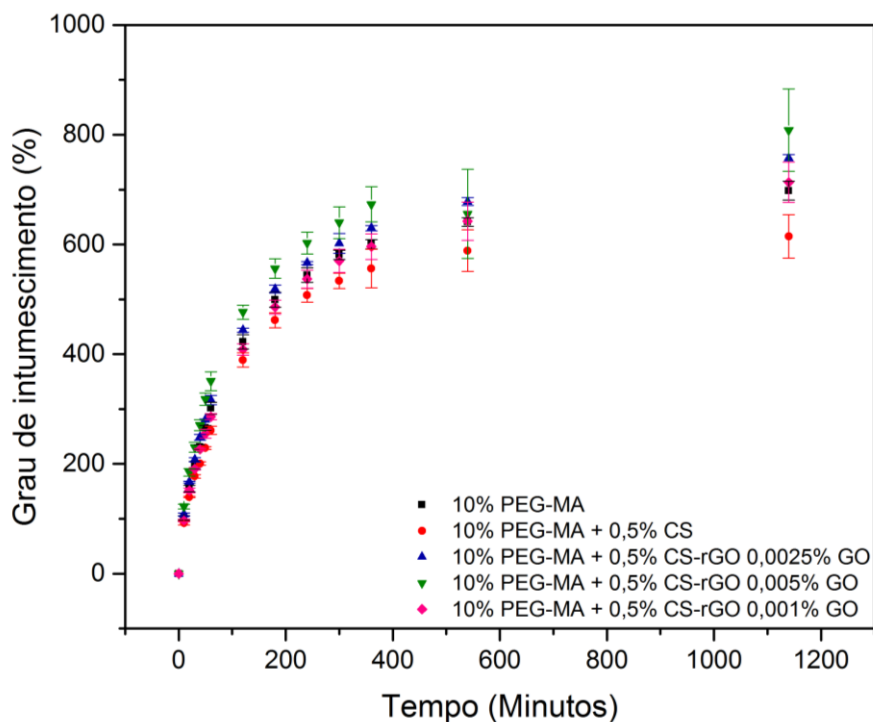


Figura 23. Gráficos do grau de intumescimento em função do tempo para os hidrogéis de 10 % PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.

A Tabela 6 apresenta os valores de grau de intumescimento máximo utilizando os diferentes sistemas de iniciadores e o desvio padrão.

Tabela 6. Valores da média e desvio padrão do grau de intumescimento máximo para os hidrogéis preparados utilizando diferentes sistemas de iniciadores.

	Q_{APS+SBS} (%)	Q_{APS+TEMED} (%)	Q_{PPS+TEMED} (%)
10% PEG-MA	513 ± 66	710 ± 135	698 ± 17
10% PEG-MA + 0,5% CS	ppt	ppt	614 ± 40
10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,0025% GO	907 ± 16	734 ± 12	757 ± 7
10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,05% GO	900 ± 24	712 ± 36	775 ± 15
10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,01% GO	751 ± 28	749 ± 54	713 ± 37

ppt = formação de precipitado no hidrogel.

Os valores do grau de intumescimento para os hidrogéis estudados variaram de acordo com o sistema de iniciadores utilizado. O sistema utilizando SBS como ativador apresentou maiores valores de intumescimento para as amostras contendo quitosana com 0,0025 % e 0,05 % de GO, em comparação com os outros sistemas, indicando um grau de reticulação menor. Já para a amostra de PEG-MA puro foi o menor valor de intumescimento, o que significa um grau de reticulação maior. Nos hidrogéis utilizando TEMED como ativador, o PEG-MA mostrou um intumescimento maior e valores semelhantes para persulfato de potássio e amônio. O sistema de iniciação utilizando SBS foi o que apresentou maior influência pela presença da quitosana. Entretanto, o grau de intumescimento para os hidrogéis contendo 0,01 % de óxido de grafeno mostrou uma diminuição significativa. A presença de uma quantidade maior do óxido de grafeno pode ter passado a influenciar na reação de reticulação a partir dessa concentração.

Os sistemas de iniciação utilizando TEMED mostraram valores semelhantes de intumescimento. Em comparação com os hidrogéis utilizando

SBS, o intumescimento dos hidrogéis contendo 0,0025 % e 0,005 % GO mostrou uma diminuição no intumescimento.

Os hidrogéis de quitosana pura foram preparados apenas com o sistema TEMED e PPS, pois nos demais sistemas apresentava precipitação. O grau de intumescimento para essa amostra é menor do que nas amostras contendo óxido de grafeno, mostrando maior grau de reticulação. A quitosana possui muitos grupos funcionais capazes de formar reticulação por interação física, o que pode explicar a diminuição do intumescimento para essa amostra. A formação da dupla reticulação nesses hidrogéis os classifica como uma rede polimérica interpenetrante (IPN). Nos hidrogéis contendo óxido de grafeno, alguns desses grupos funcionais da quitosana estão ligados ao óxido de grafeno reduzido ou estericamente impedidos, impossibilitando sua participação na reticulação. As ligações duplas do óxido de grafeno reduzido podem também abstrair alguns radicais, participando ou não da reticulação. Neste caso, a formação da reticulação de um polímero na presença de outro classifica esses tipos de hidrogéis redes poliméricas semi-interpenetrantes (semi-IPN).

O sistema de iniciadores que se mostrou mais adequado para os hidrogéis foi PPS + TEMED em virtude de ter possibilitado a formação dos hidrogéis de PEG-MA com quitosana pura sem a formação de precipitado. Este sistema de iniciadores foi utilizado na preparação dos demais hidrogéis.

5.3.1.2 Análises reológicas

5.3.1.2.1 Análise de oscilação da amplitude de deformação

A análise de oscilação da amplitude de deformação foi realizada a fim de determinar a faixa de viscoelasticidade linear do material e, desta forma, utilizar um valor presente na região para a realização da análise de oscilação de frequência e do tempo. A faixa linear representa a amostra em um estado de repouso, no qual a estrutura não é afetada pela alteração da deformação. A faixa de deformação estudada variou de 0,1 a 100 % numa frequência de 1 Hz. A análise de oscilação da amplitude foi realizada para os hidrogéis de 10%

PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO (Figura 24), utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Uma versão ampliada destas análises pode ser visualizada no item Anexos deste trabalho.

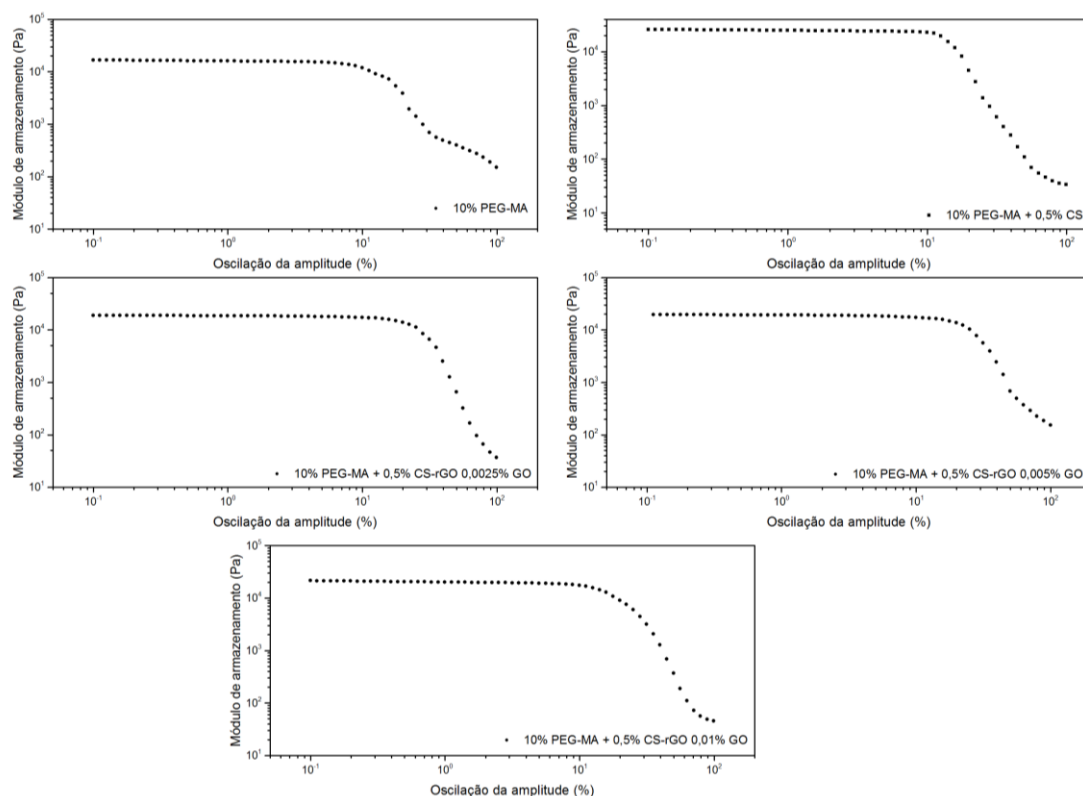


Figura 24. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10% PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.

O perfil apresentado pelos gráficos foi o esperado para géis, pois apresentaram uma larga faixa de linearidade.³⁷ A faixa de viscoelasticidade linear está relacionada ao comportamento do material diante de uma força aplicada, dentro dessa faixa o material tem o mesmo comportamento que em repouso. Os valores obtidos para a faixa de viscoelasticidade linear dos hidrogéis vai de 0,1 a 12 % de deformação. As análises de oscilação da frequência e do tempo foram realizadas com 10 % de deformação.

5.3.1.2.2 Análise da oscilação da frequência

A análise de oscilação da frequência foi realizada para determinar os valores de módulo de elasticidade para os materiais, bem como para obter a região linear de frequência que será usada para realizar a análise de oscilação do tempo. A faixa de frequência investigada foi de 0,01 a 100 Hz com deformação de 10 %.

As análises de oscilação da frequência foram realizadas para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO (Figura 25). O módulo de armazenamento (G') mostrou-se praticamente constante durante toda a faixa de frequência analisada para todos os hidrogéis, demonstrando uma faixa de viscoelasticidade linear ampla. Esse tipo de comportamento é comum para hidrogéis, no qual a componente elástica é muito maior que a viscosa, como pode ser observado pela diferença entre os módulos de perda e de armazenamento.

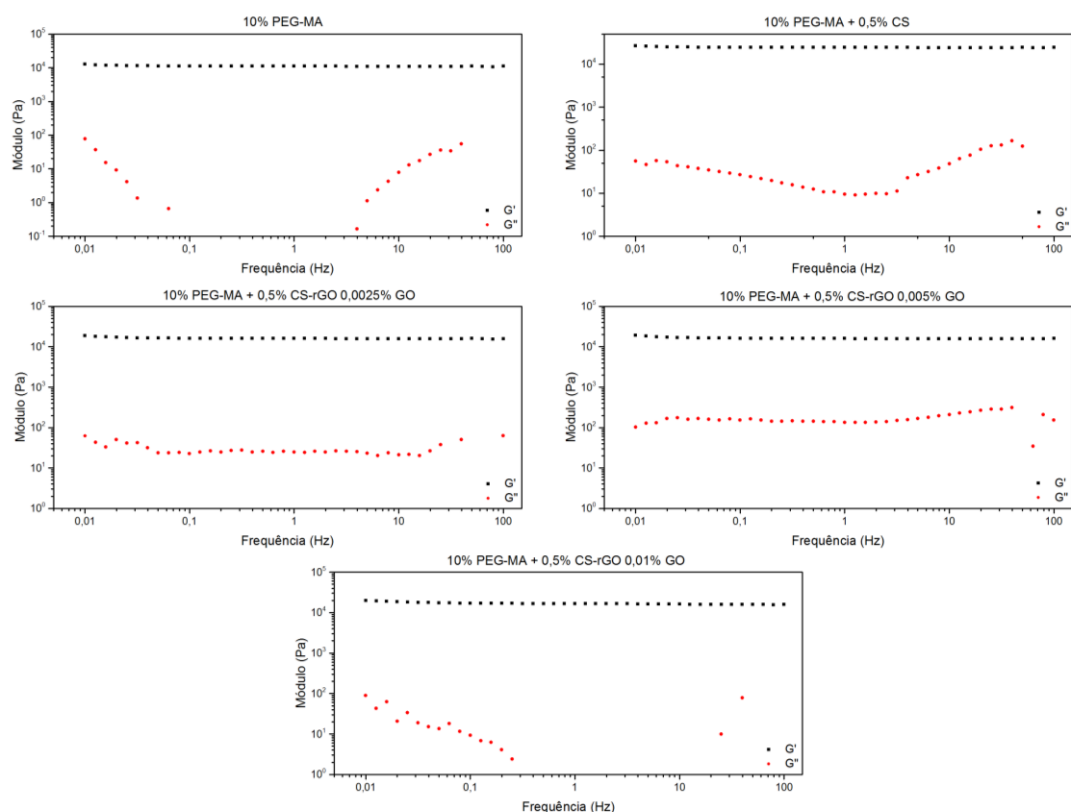


Figura 25. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10% PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).

A Tabela 7 apresenta os valores de módulo de elasticidade dos hidrogéis com 1 e 10 Hz de frequência. Através dos valores dos módulos de elasticidade obtidos para os hidrogéis é possível buscar uma aplicação viável comparando com os de tecidos naturais. Pode se observar que os valores entre as amostras apresentaram apenas uma pequena variação de uma frequência para outra. Materiais como os hidrogéis apresentam uma faixa linear larga nesse tipo de experimento por possuir maior comportamento elástico que viscoso.

Tabela 7. Valores de média e desvio padrão dos módulos de elasticidade (G') e módulos de perda (G'') obtidos para os hidrogéis estudados a partir da análise de oscilação da frequência com 1 e 10 Hz.

Amostra	1 Hz		10 Hz	
	G' (kPa)	G'' (kPa)	G' (kPa)	G'' (kPa)
10% PEG-MA	11,4 $\pm 1,1$	$1 \cdot 10^{-3}$ $\pm 7 \cdot 10^{-4}$	11,2 $\pm 1,1$	$8,3 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1 \cdot 10^{-3}$
10% PEG-MA + 0,5% CS	24,3 $\pm 0,5$	$9,4 \cdot 10^{-3}$ $\pm 4 \cdot 10^{-3}$	24,2 $\pm 0,5$	$4,8 \cdot 10^{-2}$ $\pm 3 \cdot 10^{-3}$
10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO (0,0025% GO)	16,0 $\pm 0,5$	$6,9 \cdot 10^{-3}$ $\pm 4 \cdot 10^{-3}$	15,8 $\pm 0,5$	$1 \cdot 10^{-3}$ $\pm 3,7$
10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO (0,005% GO)	15,9 $\pm 1,0$	$1,7 \cdot 10^{-2}$ $\pm 9 \cdot 10^{-3}$	15,7 $\pm 1,1$	$3,9 \cdot 10^{-2}$ $\pm 1 \cdot 10^{-2}$
10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO (0,01% GO)	16,7 $\pm 3,5$	$6,0 \cdot 10^{-3}$ $\pm 6 \cdot 10^{-3}$	16,2 $\pm 3,6$	$2,1 \cdot 10^{-2}$ $\pm 2 \cdot 10^{-2}$

O módulo de elasticidade aumentou consideravelmente com a adição da quitosana pura quando comparado ao hidrogel contendo apenas PEG-MA. Esse aumento na propriedade mecânica pode estar associado à reticulação da quitosana além da reticulação do PEG-MA. A quitosana é um polímero catiônico e pode formar ligações cruzadas através de interações físicas como ligações hidrogênio. O aumento do grau de reticulação está associado diretamente ao aumento do módulo de armazenamento, apresentando características mais elásticas ao hidrogel.

A introdução do óxido de grafeno causa a diminuição do módulo de elasticidade, em comparação com a amostra contendo quitosana pura. No entanto, mostra-se constante para todas as concentrações de óxido de grafeno, variando apenas o desvio padrão, que aumenta à medida que a concentração de GO aumenta. Esse resultado indica que a presença do óxido

de grafeno pode interferir na reação de reticulação. A sua presença interfere mais com o aumento concentração, influenciando no desvio padrão das análises, que vão sendo menos semelhantes à medida que a concentração de GO aumenta. O rGO ligado a quitosana pode impedir que ocorra a interação física entre as cadeias de CS, e dessa forma as ligações cruzadas por interação física não sejam tão pronunciadas quanto na CS pura.

A diferença entre os valores de módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') é um parâmetro importante a ser observado, quanto maior a diferença entre eles, maior rigidez o material apresenta. Os hidrogéis estudados apresentam o G' muito maior que o G'' e, portanto, possuem uma grande rigidez.

O $\tan\delta$ (G''/G') representa o comportamento viscoelástico do material, quando seu valor diminui de 0,01, o material é considerado idealmente elástico. Os valores de $\tan\delta$ encontrados para todos os hidrogéis estudados mostraram-se menores que esse valor, possuem G' muito superior a G'' , e por isso são considerados idealmente elásticos.

Os valores de módulo de elasticidade encontrado para os hidrogéis de quitosana contendo óxido de grafeno (cerca de 16 kPa) estão dentro da faixa encontrada para tecidos musculares naturais, que variam de 8 a 17 kPa.¹¹²

5.3.1.2.3 Análise da oscilação do tempo

As análises de oscilação do tempo foram realizadas por 1800 s, em triplicata para cada um dos cinco tipos de hidrogel. Os parâmetros utilizados foram frequência de 1 Hz e deformação de 10 %, esses valores estão dentro da faixa de linearidade mostrada nos ensaios de oscilação da amplitude e da frequência. Os hidrogéis foram preparados com concentração de 10 mmol L⁻¹ do sistema de iniciadores. Em virtude da alta velocidade da reação de reticulação dos hidrogéis, não foi possível observar o cruzamento das curvas de módulo de armazenamento e módulo de perda, pois quando a análise se inicia a reação já ultrapassou este ponto. A análise de oscilação do tempo foi realizada para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 %

CS, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO (Figura 26).

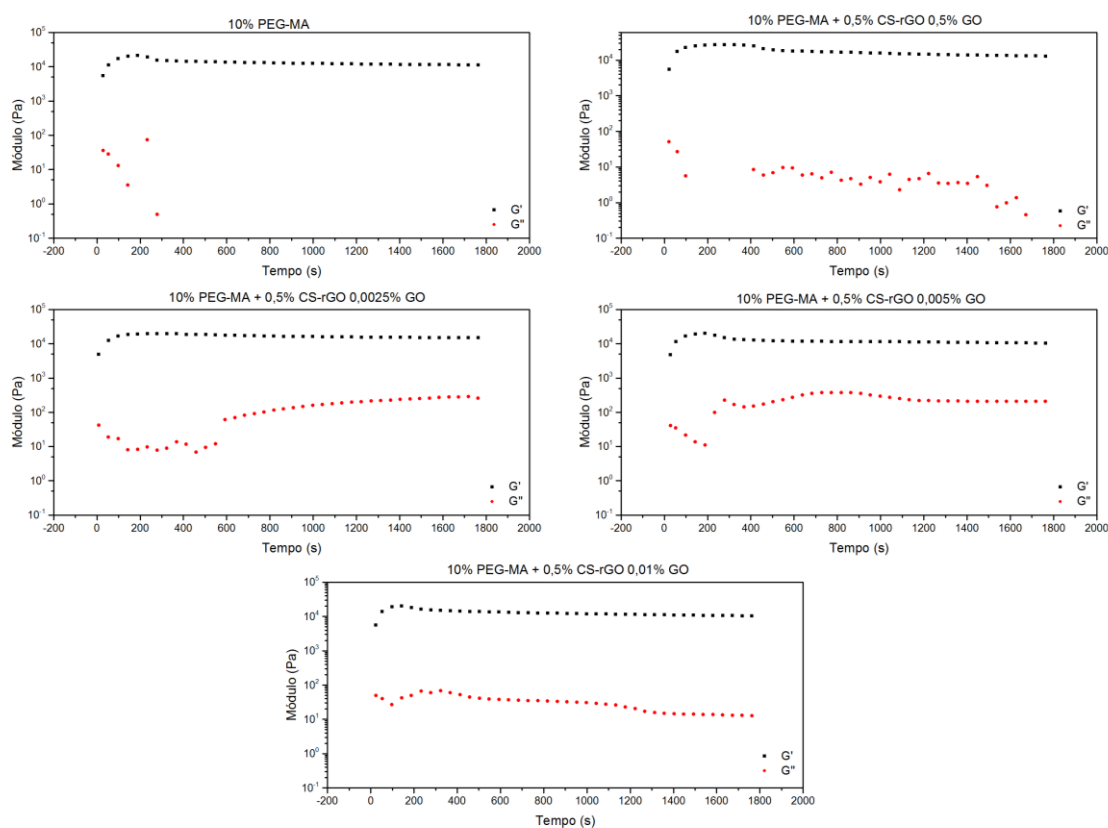


Figura 26. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10% PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (10 mmol L^{-1}). Análise realizada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.

Como forma de obter um gráfico que apresente a etapa de formação do gel, a análise foi reproduzida utilizando 1 mmol L^{-1} do sistema de iniciadores, ou seja, uma concentração 10 vezes menor. Mesmo com a diminuição da concentração do sistema de iniciadores foi difícil de observar a transição sol-gel do material. A análise de oscilação do tempo com 1 mmol L^{-1} foi realizada para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO (Figura 27).

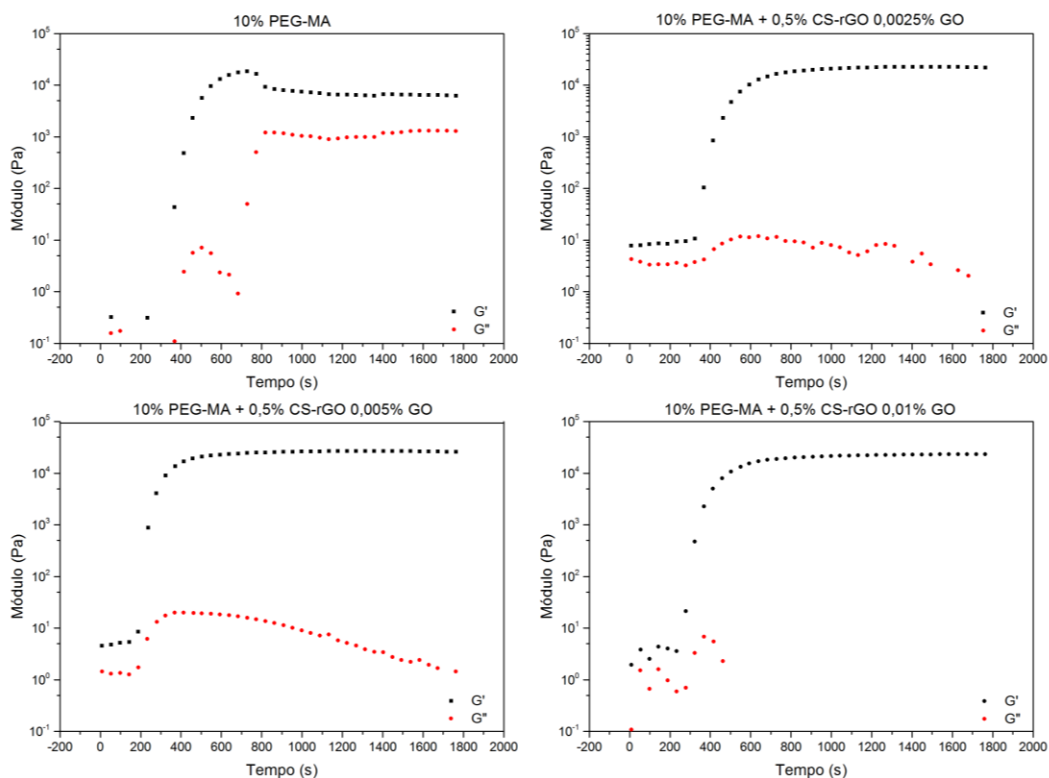


Figura 27. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10% PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (1 mmol L⁻¹). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.

Desta forma, os tempos necessários para os hidrogéis atingirem o patamar da curva do módulo de armazenamento foram determinados como os tempos de reticulação total, utilizando o sistema com 10 mmol L⁻¹ de sistema de iniciadores. O tempo de reticulação total dos hidrogéis foi estabelecido como o tempo mínimo onde o módulo de armazenamento permanece constante, o qual foi de cerca de 300 segundos.

5.3.1.3 Condutividade elétrica

A fim de determinar se a presença do óxido de grafeno reduzido nos hidrogéis o tornaria condutor, análises de condutividade elétrica foram realizadas. Na Figura 28 são mostrados os gráficos de corrente x potencial (I x

V) dos hidrogéis contendo rGO, em comparação com os formados de PEG-MA puro e PEG-MA + quitosana. As curvas apresentam uma faixa inicial, onde $I \times V$ não é constante, antes de atingir a linearidade, que está associada a estabilização do sistema. Alguns hidrogéis demonstraram oscilações no final da análise que estão associadas às alterações nas amostras causadas pelo aumento do potencial.

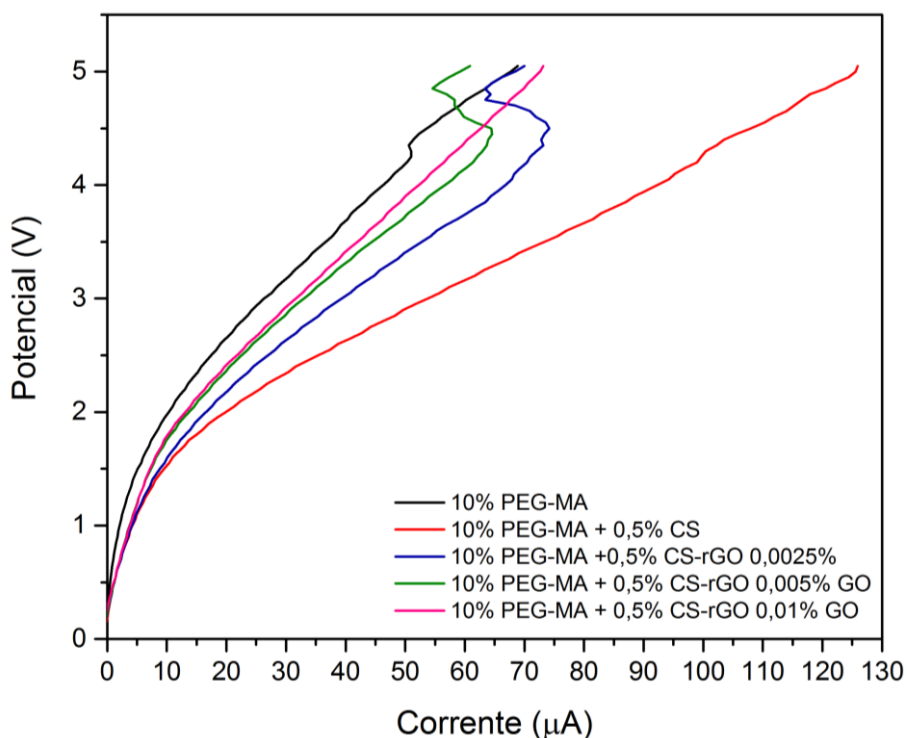


Figura 28. Gráfico da análise de condutividade elétrica para os hidrogéis de 10 % PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED. A análise foi realizada a 20°C.

Na Tabela 8 estão os valores de condutividade obtidos através da equação da curva da região linear dos gráficos. A partir dos valores encontrados pode-se concluir que a condutividade elétrica (σ) encontrada para os hidrogéis não variou consideravelmente, por todos os valores permanecem na faixa de $10^{-5} \text{ S cm}^{-1}$. A redução do óxido de grafeno através da reação com a quitosana pode levar à formação de defeitos na estrutura do rGO. Esses defeitos impedem a passagem de corrente elétrica através das folhas de rGO. Eles estão associados a redução incompleta dos grupos funcionais de oxigênio

presentes na cadeia do GO ou aos grupos que se ligam a cadeia de quitosana. A condutividade encontrada para tecidos musculares naturais parte de 10^{-4} S cm^{-1} .⁹⁹ Sendo assim, os valores encontrados para os hidrogéis preparados estariam, talvez, no limite mínimo de valores de condutividade para a aplicação como *scaffolds* para regeneração de tecido muscular.

Tabela 8. Valores de média e desvio padrão da condutividade elétrica obtida para os hidrogéis através da Equação 2.

Amostra	10 % PEG- MA	10 % PEG- MA + 0,5 % CS	10 % PEG- MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO	10 % PEG- MA + 0,5 % CS-rGO 0,05 % GO	10 % PEG- MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO
σ (S cm^{-1})	$4,34 \cdot 10^{-5}$ $\pm 1,91 \cdot 10^{-5}$	$7,18 \cdot 10^{-5}$ $\pm 2,22 \cdot 10^{-5}$	$5,48 \cdot 10^{-5}$ $\pm 2,49 \cdot 10^{-5}$	$5,06 \cdot 10^{-5}$ $\pm 3,47 \cdot 10^{-5}$	$4,53 \cdot 10^{-5}$ $\pm 2,65 \cdot 10^{-5}$

σ : condutividade elétrica

5.3.1.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada para avaliar o comportamento de degradação térmica dos hidrogéis. A Figura 29 mostra os termogramas de TGA para as amostras de hidrogéis desidratados contendo 10 % PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.

A primeira perda de massa, que vai até cerca de 200 °C, corresponde a desidratação da quitosana. Santos e colaboradores estudaram o comportamento de degradação térmica da quitosana e determinaram a faixa de temperatura de 179 até 862 °C.¹¹³ A perda de massa em cerca de 410 °C corresponde a degradação do PEG-MA.¹¹⁴ Como a composição dos hidrogéis é majoritariamente de PEG-MA e este degrada dentro da faixa de temperatura na

qual a quitosana degrada, o comportamento de degradação da quitosana não é observada com clareza nos termogramas.

Em relação ao óxido de grafeno reduzido utilizado nos hidrogéis, não foi possível detectar a sua presença nos termogramas através da técnica utilizada, pois a sua concentração é muito baixa.

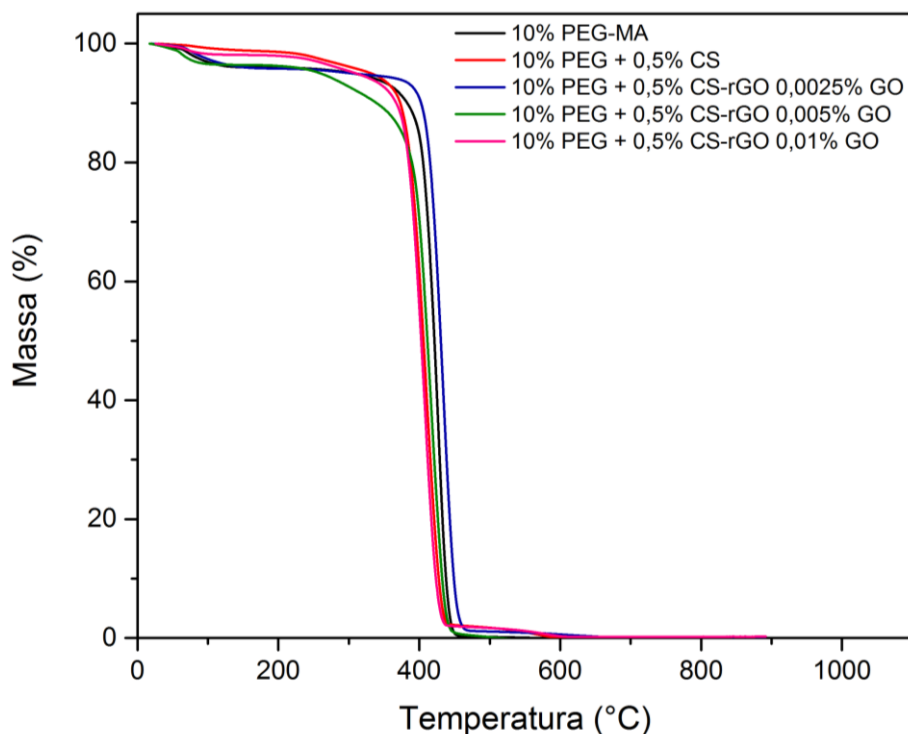


Figura 29. Termograma de TGA para os hidrogéis secos contendo 10 % PEG-MA, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.

5.3.1.5 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras dos hidrogéis liofilizados foram analisadas através de MEV afim de obter informações sobre a superfície do material e sua porosidade. A Figura 30 apresenta as imagens obtidas por MEV para duas amostras de hidrogéis, sendo uma do hidrogel contendo apenas o PEG-MA (Figura 30A) e outra do hidrogel contendo CS-rGO (Figura 30B). Nas imagens de MEV não foi possível observar a estrutura celular característica dos hidrogéis. O que se

observa, no entanto, é que possivelmente os poros dos hidrogéis colapsaram durante a secagem das amostras.

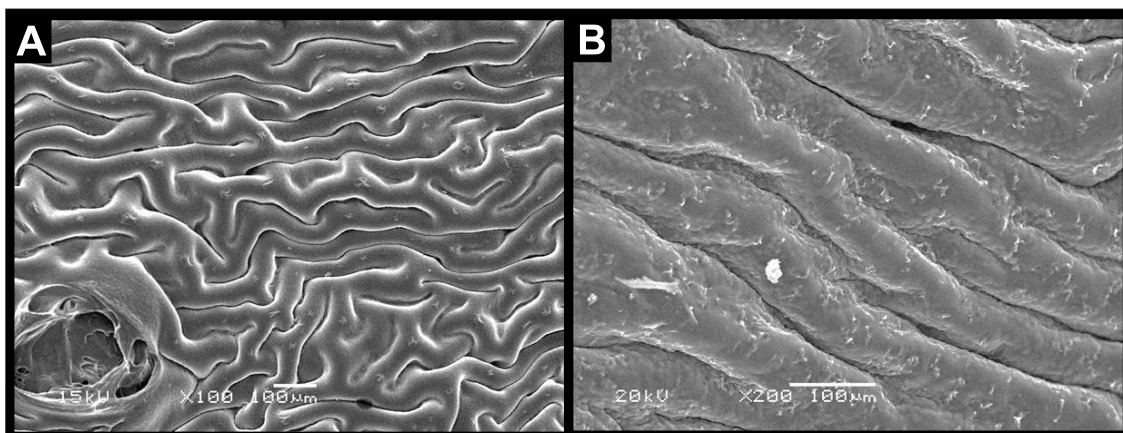


Figura 30. Imagens de MEV dos hidrogéis contendo apenas PEG-MA (A) e de um hidrogel contendo CS-rGO (B).

5.3.2 *Hidrogéis de CS-rGO contendo diferentes concentrações de PEG-MA*

As propriedades mecânicas dos biomateriais aplicados à ET são de grande importância. Através delas é possível determinar o tipo de tecido natural que o biomaterial é capaz de mimetizar. As concentrações de PEG-MA nos hidrogéis foram variadas com o intuito de estudar a forma como o grau de reticulação afetaria nas propriedades mecânicas. Desta forma, foram preparados hidrogéis contendo 5, 10 e 20 % de PEG-MA e 0,5 % de CS-rGO com 0,01 % GO. A CS-rGO com 0,01 % GO foi selecionada para os próximos estudos por apresentar módulo de elasticidade dentro da faixa encontrada para tecidos musculares naturais e por conter maior concentração de óxido de grafeno reduzido.

5.3.2.1 *Grau de intumescimento*

A Figura 31 apresenta o gráfico do grau de intumescimento para os hidrogéis com diferentes quantidades de PEG-MA (5, 10 e 20 % m/m).

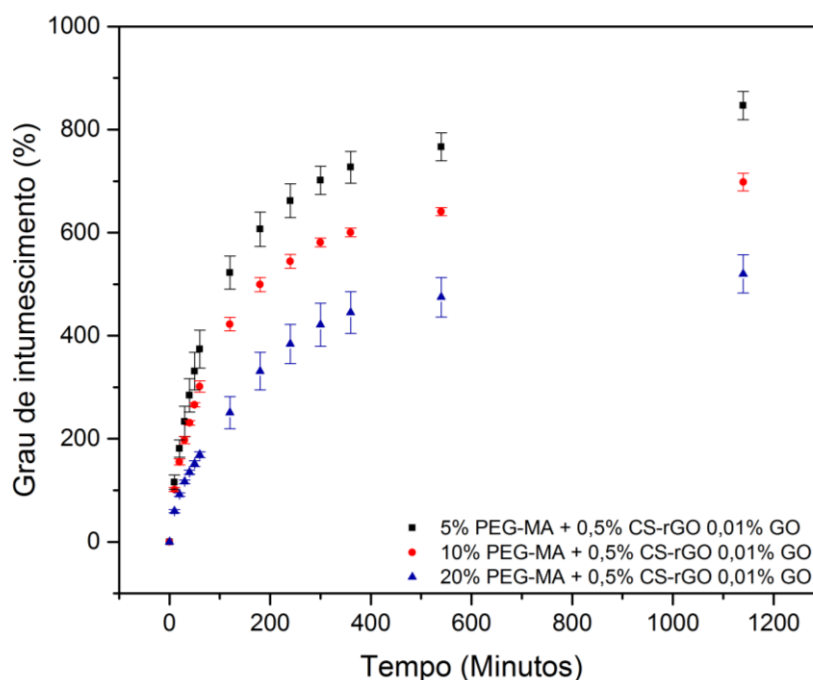


Figura 31. Gráfico do grau de intumescimento em função do tempo para os hidrogéis de 5 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO e 20 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores persulfato de potássio e TEMED.

O grau de intumescimento para os hidrogéis variando a quantidade de PEG-MA mostra-se de acordo com o esperado. À medida que a quantidade de PEG-MA aumenta, há formação de mais reticulações e redes menores, diminuindo assim o grau de intumescimento. Além disso, a quantidade de polímero presente num mesmo volume é aumentada, o que também auxilia na diminuição da absorção de líquidos. Os valores de grau de intumescimento em 24 horas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores de média e desvio padrão do grau de intumescimento para os hidrogéis com diferentes quantidades de PEG-MA depois de 24 horas.

	Q_{PPS+TEMED} (%)
5% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,01% GO	847 ± 27
10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,01% GO	713 ± 37
20% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,01% GO	520 ± 37

5.3.2.2 Análises reológicas

A análise reológica da oscilação de amplitude de deformação foi realizada para determinar a faixa linear de viscoelasticidade, que permaneceu entre 0,01 e 10 % de deformação para os hidrogéis com concentrações diferentes de PEG-MA. Nas amostras contendo 20 % de PEG-MA, a faixa de linearidade ficou menor em 10 % de deformação. Isso significa que a amostra passou a ser afetada pela oscilação da amplitude, o que pode estar associado a maior quantidade de polímero presente na composição. Como consequência das observações anteriores, se estabeleceu uma deformação de 10 % como adequada para utilizar nas análises de oscilação da frequência mesmo com a variação nas amostras com maior concentração de PEG-MA. As análises de oscilação da amplitude foram realizadas para os hidrogéis contendo 5 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO e 20 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO (Figura 32).

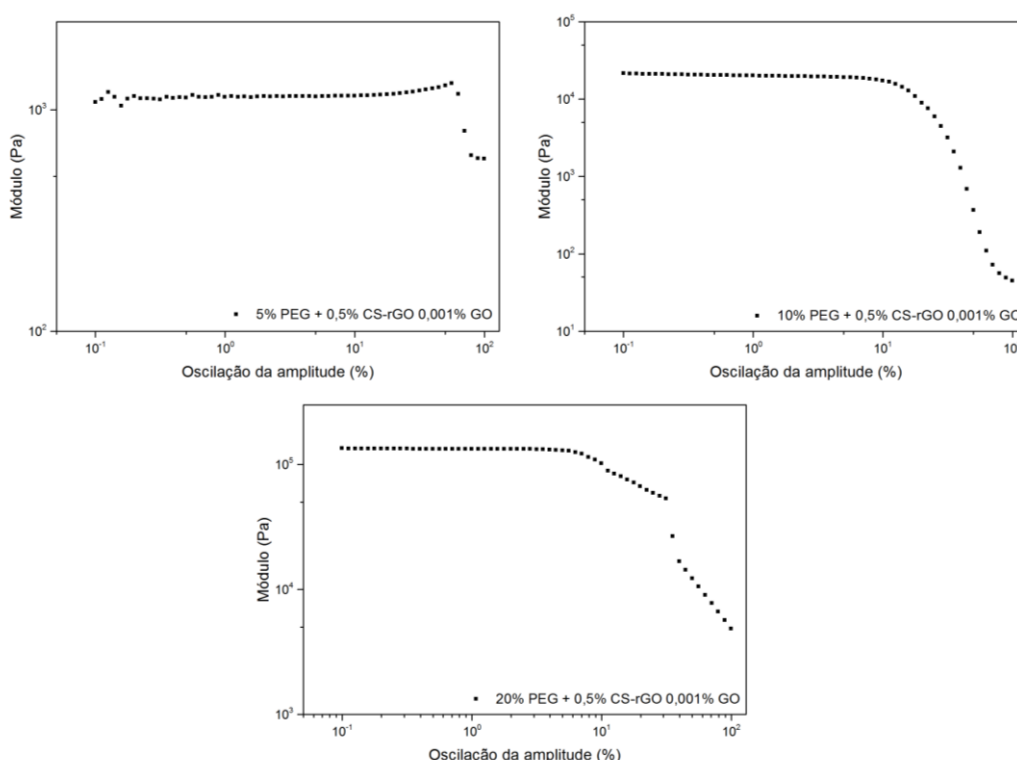


Figura 32. Gráficos de reologia da análise de oscilação da amplitude da deformação para os hidrogéis contendo 5 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO e 20 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.

As análises reológicas de oscilação da frequência apresentaram um perfil linear, como já constatado em amostras anteriores, e esperado para hidrogéis, mostrando um perfil mais elástico e menos viscoso. A linearidade persistiu ao longo de toda faixa de frequência analisada. As análises de oscilação da frequência foram realizadas para os hidrogéis contendo 5 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO e 20 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO (Figura 33).

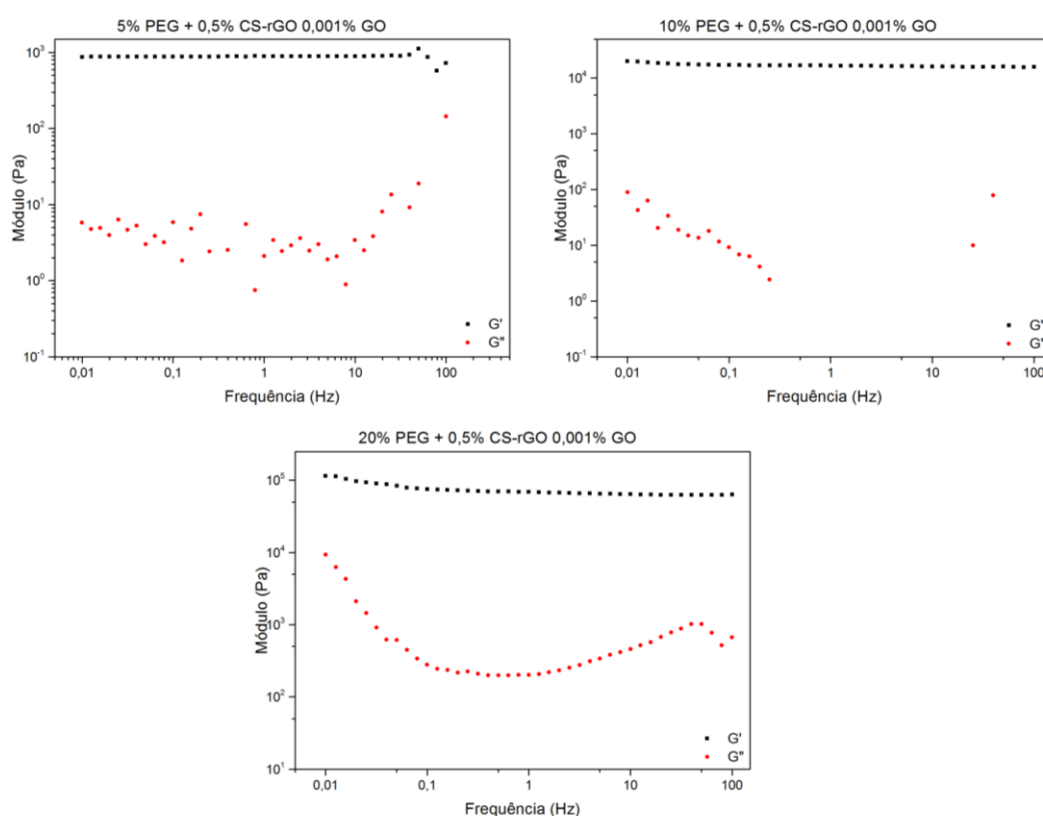


Figura 33. Gráficos de reologia obtidos através da análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 5 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO e 20 % PEG + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).

Os valores de módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') (média e desvio padrão) das análises de reologia dos hidrogéis contendo diferentes quantidades de PEG-MA estão apresentados na Tabela 10. Os valores de módulo de elasticidade mostraram diferenças apreciáveis entre as amostras. Os hidrogéis contendo menor quantidade de PEG-MA (5 %) e,

portanto, menor grau de reticulação, apresentaram valores de G' abaixo de 1 kPa. Entretanto, o módulo de elasticidade subiu para 16 kPa quando a quantidade de PEG-MA foi dobrada (10 %), próximo ao valor já encontrado em estudo prévio na Tabela 7. Os hidrogéis contendo 20 % de PEG-MA, por sua vez, apresentaram módulo de elasticidade acima de 60 kPa. Esse aumento de grandeza no módulo de armazenamento corrobora com os resultados obtidos para o grau de intumescimento dos hidrogéis. Quanto maior a quantidade de PEG-MA presente na composição, maior o grau de reticulação e menor a rede reticulada, o que leva a uma diminuição na capacidade de absorção de água e um aumento na propriedade mecânica, tornando o hidrogel mais rígido.

O grande contraste encontrado entre os módulos de elasticidade dos hidrogéis com diferentes proporções de PEG-MA permite a busca por aplicações em tecidos nativos com propriedades muito distintas. Além disso, demonstra a facilidade de variar propriedades mecânicas quando polímeros sintéticos são utilizados.

Tabela 10. Valores de módulo de elasticidade (G') e módulo de perda (G'') obtidos para os hidrogéis estudados a partir da análise de oscilação da frequência com 1 e 10 Hz.

Amostra	1 Hz		10 Hz	
	G' (kPa)	G'' (kPa)	G' (kPa)	G'' (kPa)
5% PEG-MA + 0,5% CS-rGO (0,01% GO)	$8,9 \cdot 10^{-1}$ $\pm 3 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$ $\pm 2 \cdot 10^{-3}$	$9,0 \cdot 10^{-1}$ $\pm 3 \cdot 10^{-1}$	$3,5 \cdot 10^{-3}$ $\pm 3 \cdot 10^{-3}$
10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO (0,01% GO)	16,7 $\pm 3,5$	$6,0 \cdot 10^{-3}$ $\pm 6 \cdot 10^{-3}$	16,2 $\pm 3,6$	$2,1 \cdot 10^{-2}$ $\pm 2 \cdot 10^{-2}$
20% PEG-MA + 0,5% CS-rGO (0,01% GO)	68,8 $\pm 11,2$	$2,0 \cdot 10^{-1}$ $\pm 5 \cdot 10^{-2}$	64,0 $\pm 10,5$	$5,0 \cdot 10^{-1}$ $\pm 2 \cdot 10^{-1}$

5.3.2.3 Condutividade elétrica

A Figura 34 mostra o gráfico de I x V para os hidrogéis. A parte inicial das curvas corresponde à estabilização do material. A condutividade foi calculada utilizando a porção linear da curva. O hidrogel contendo 20 % de PEG-MA apresenta uma oscilação no final da análise em razão de alterações sofridas pelo material com o aumento do potencial.

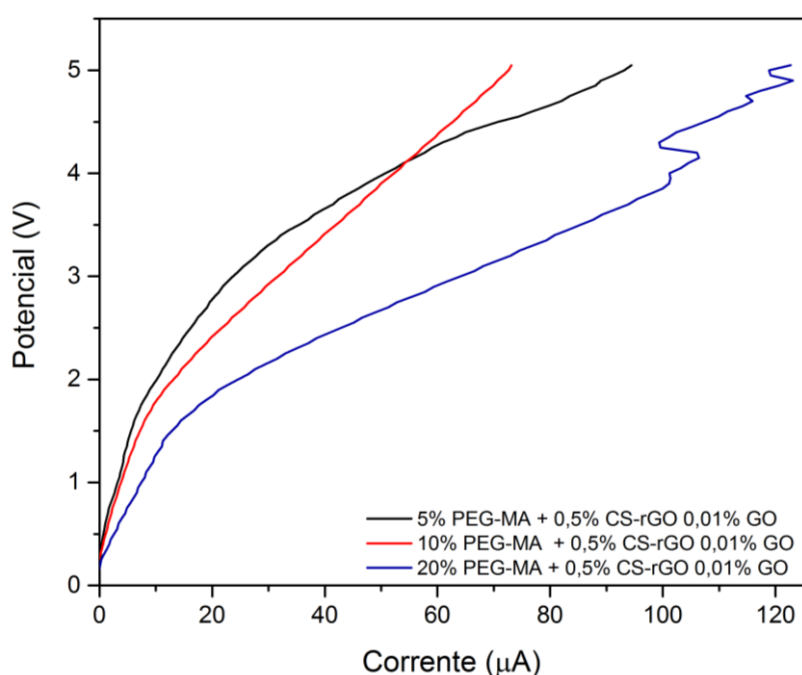


Figura 34. Gráfico da análise de condutividade para os hidrogéis de 5 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO e 20-MA % PEG + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.

As condutividades encontradas para os hidrogéis contendo diferentes quantidades de PEG-MA não mostraram diferenças significativas. A Tabela 11 mostra os valores encontrados para a condutividade através da equação da reta da região linear.

Tabela 11. Valores de condutividade obtidos para os hidrogéis através da Equação 2.

	5% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,01% GO	10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,01% GO	20% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,01% GO
σ (S cm⁻¹)	7,38.10 ⁻⁵ ± 6,73.10 ⁻⁶	4,53.10 ⁻⁵ ± 2,65.10 ⁻⁵	9,01.10 ⁻⁵ ± 7,30.10 ⁻⁵

5.3.3 Hidrogéis de CS-rGO contendo diferentes concentrações de quitosana

Polímeros naturais, como a quitosana, agregam características biológicas interessantes aos *scaffolds* estudados na ET. A presença da quitosana nos hidrogéis de PEG-MA proporciona mudanças em suas propriedades mecânicas e físico-químicas, além de proporcionar uma melhor biocompatibilidade do *scaffold* com o meio biológico. A estrutura da quitosana possui uma estrutura complexa onde, alguns dos seus grupos funcionais podem participar da reação de reticulação do hidrogel. Essa participação pode ser influenciada pela concentração da quitosana, bem como pela presença do óxido de grafeno reduzindo.

Hidrogéis contendo diferentes concentrações de quitosana, com e sem óxido de grafeno reduzido, foram estudados para avaliar como a reticulação do hidrogel varia nas suas presenças. A quitosana foi estudada nas concentrações de 0,5, 1 e 2 %, sem e com 0,01 % de óxido de grafeno.

5.3.3.1 Grau de intumescimento

O gráfico do grau de intumescimento para os hidrogéis com diferentes quantidades de quitosana estão mostrados na Figura 35. As amostras foram preparadas com quitosana pura e com quitosana contendo óxido de grafeno

reduzido. Assim, foi possível avaliar a influência da quitosana e do óxido de grafeno reduzido.

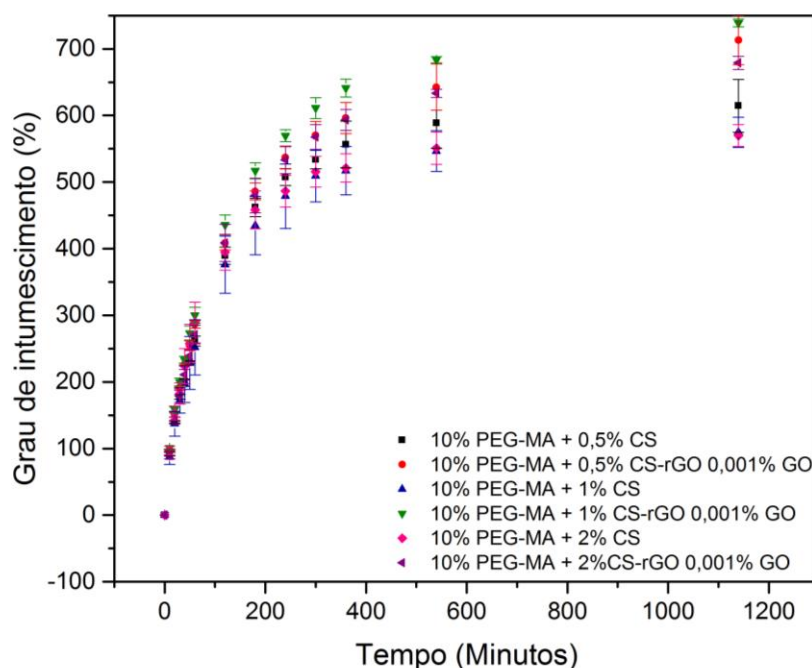


Figura 35. Gráfico do grau de intumescimento em função do tempo para os hidrogéis de 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 1 % CS-rGO 0,01 % GO e 10 % PEG-MA + 2 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.

Os valores encontrados para o intumescimento máximo dos hidrogéis variando a quitosana não mostraram variações significativas (Tabela 12). No entanto, quando há presença de rGO no hidrogel, o grau de intumescimento aumenta. Isso mostra que a estrutura do rGO interfere na reação de reticulação do hidrogel, tornando o grau de reticulação menor quando comparado aos valores dos hidrogéis de quitosana pura. Essa interferência pode ocorrer pois o óxido de grafeno está ligado a quitosana e pode impedir que parte dos grupos funcionais da quitosana formem ligações cruzadas físicas.

Tabela 12. Valores de média e desvio padrão do grau de intumescimento máximo para os hidrogéis.

	QPPS+TEMED (%)
10% PEG-MA + 0,5% CS	615 ± 40
10% PEG-MA + 1% CS	575 ± 23
10% PEG-MA + 2% CS	570 ± 16
10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,01% GO	713 ± 37
10% PEG-MA + 1% CS-rGO 0,01% GO	739 ± 7
10% PEG-MA + 2% CS-rGO 0,01% GO	679 ± 10

5.3.3.2 Análises reológicas

As análises de oscilação da amplitude de deformação foram realizadas para obter a faixa de viscoelasticidade linear das amostras de hidrogéis com diferentes concentrações de quitosana. As análises foram realizadas para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 1 % CS, 10 % PEG-MA + 2 % CS (Figura 36), 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 1 % CS-rGO 0,01 % GO e 10 % PEG-MA + 2 % CS-rGO 0,01 % GO (Figura 37).

O perfil das curvas se mostra semelhante, com uma grande faixa linear e valores de módulo de armazenamento altos. A deformação de 10 % foi utilizada para as análises de oscilação da frequência e está dentro da faixa de viscoelasticidade linear para todas os hidrogéis.

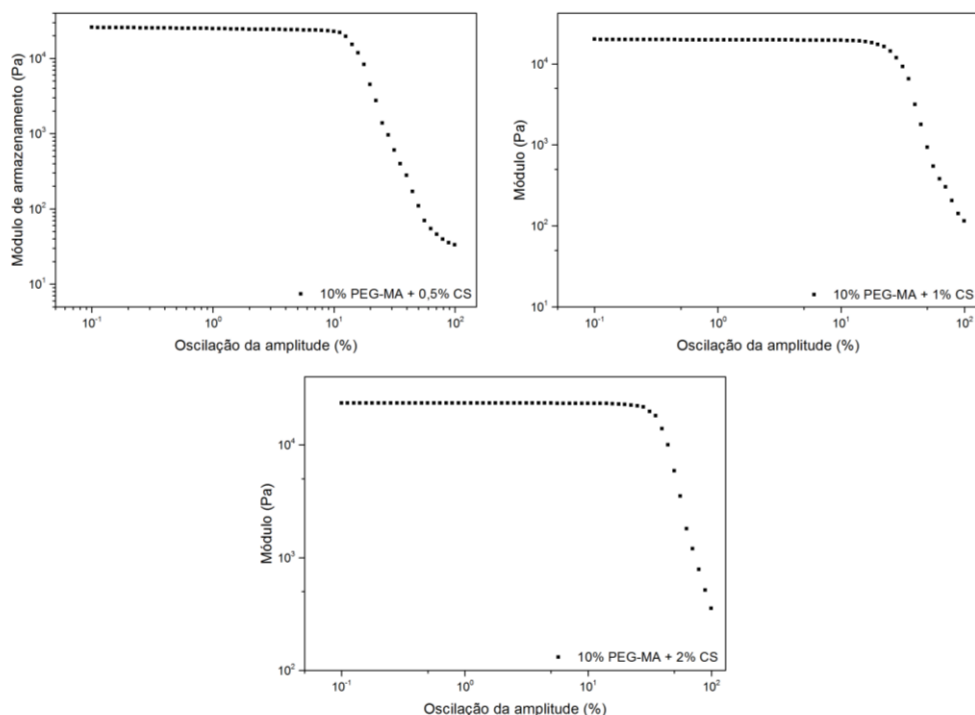


Figura 36. Gráficos de reologia da análise de oscilação da amplitude da deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 1 % CS e 10 % PEG-MA + 2 % CS utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.

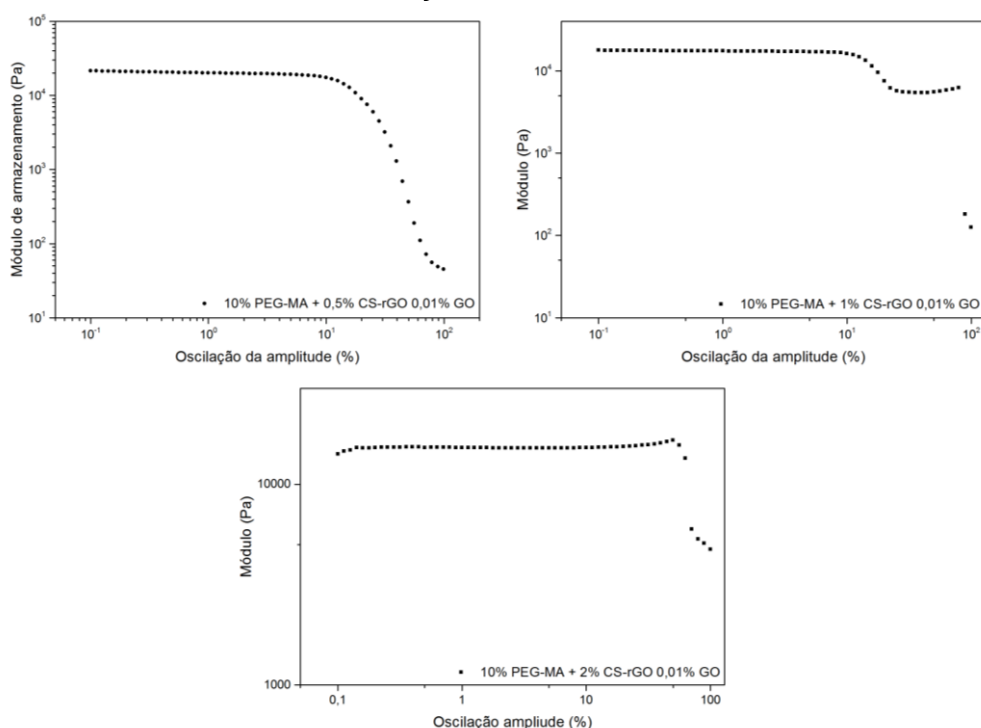


Figura 37. Gráficos de reologia da análise de oscilação da amplitude da deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 1 % CS-rGO 0,01 % GO e 10 % PEG-MA + 2 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.

As análises reológicas de oscilação da frequência foram realizadas para determinar o módulo de elasticidade dos hidrogéis. As amostras analisadas foram as de composição: 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 1 % CS, 10 % PEG-MA + 2 % CS (Figura 38), 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 1 % CS-rGO 0,01 % GO e 10 % PEG-MA + 2 % CS-rGO 0,01 % GO (Figura 39).

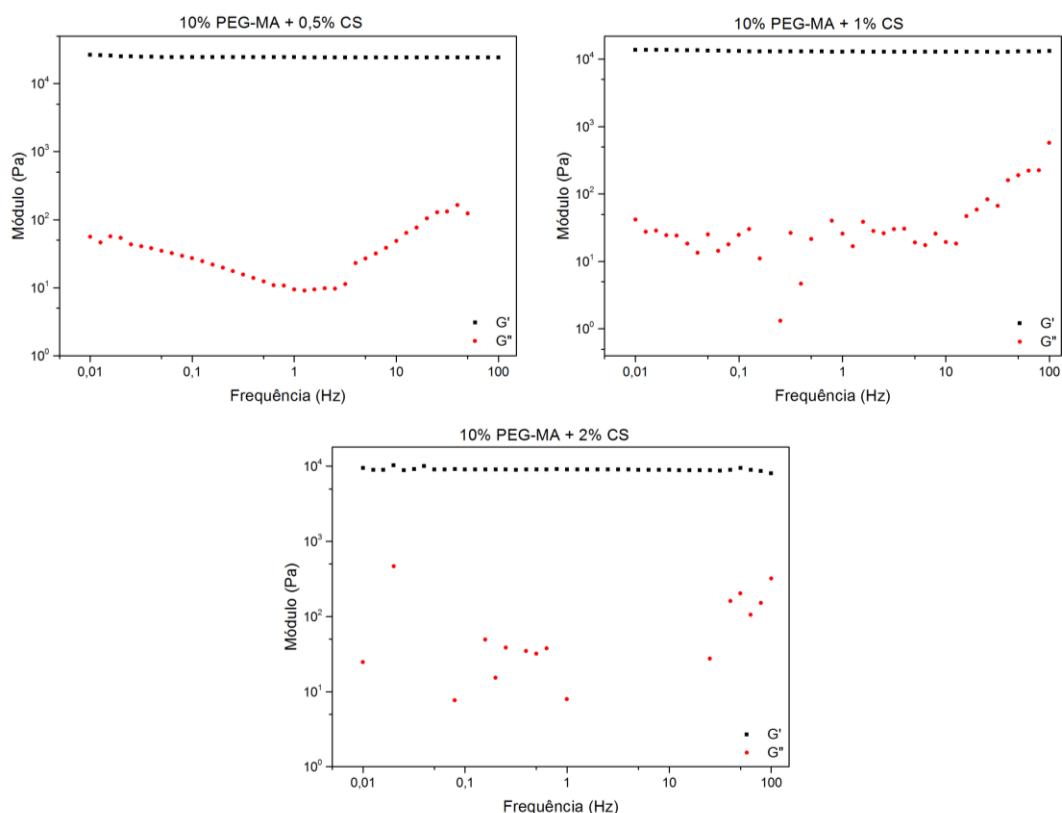


Figura 38. Gráficos de reologia obtidos através da análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 1 % CS e 10 % PEG-MA + 2 % CS utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).

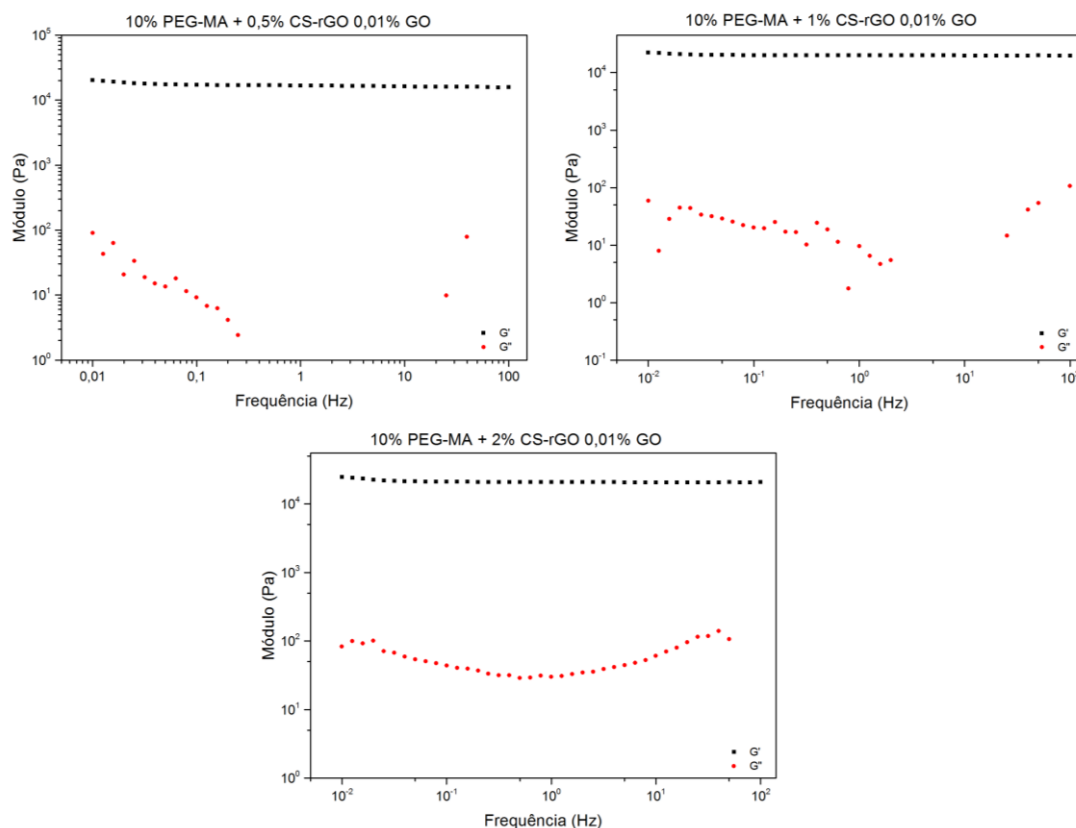


Figura 39. Gráficos de reologia obtidos através da análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 1 % CS-rGO 0,01 % GO e 10 % PEG-MA + 2 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).

Os valores de módulo de elasticidade e módulo de perda para as frequências de 1 e 10 Hz estão mostrados na Tabela 13. Nos hidrogéis contendo quitosana pura, o módulo de elasticidade diminuiu significativamente com o aumento da concentração de quitosana. A amostra contendo 0,5 % de CS apresentou um aumento de módulo expressivo quanto comparado ao do PEG-MA puro, de 11 kPa para 24 kPa, porém quando a concentração de CS aumentou para 1 e 2 % uma queda no módulo foi observada, 13 e 9 kPa, respectivamente. A quitosana é um polímero natural e possui propriedades mecânicas pobres quando comparadas a de polímeros sintéticos. O aumento de sua concentração no hidrogel pode, portanto, causar uma diminuição nos valores de módulo de elasticidade. O grau de intumescimento para essas amostras mostrou uma variação muito pequena, não significativa

estatisticamente, porém as propriedades viscoelásticas sofreram uma mudança mais expressiva.

No caso dos hidrogéis de quitosana com rGO, o aumento da concentração de quitosana causou uma tendência ao aumento do módulo de elasticidade. Esse resultado pode estar associado a presença do rGO no hidrogel. O grau de intumescimento variou pouco para essas amostras, apresentando uma variação mais significativa entre as amostras contendo 1 e 2 % de CS. Porém, as diferenças entre os módulos das três amostras contendo óxido de grafeno reduzido não é significativa estatisticamente. O óxido de grafeno e seus derivados possuem características estruturais conhecidas por melhorar as propriedades mecânicas, como as interações π - π entre as folhas de óxido de grafeno reduzido. A sua presença na composição do hidrogel proporcionou a estabilização das propriedades reológicas com o aumento da concentração de quitosana.

Entretanto, quando os hidrogéis contendo 0,5 % CS são comparados, é possível observar o que contém quitosana pura apresenta maior módulo de elasticidade e menor grau de intumescimento. Nesse ponto, os dois resultados levam a interpretar que o grau de reticulação é maior nos hidrogéis de quitosana pura. Essa associação não pode ser feita para os hidrogéis com 1 e 2 % CS. Os hidrogéis que contém rGO possuem maior módulo de elasticidade e maior grau de intumescimento. Esse resultado leva a crer que a presença de maiores concentrações de quitosana pura leva a diminuição das propriedades mecânicas enquanto a presença de rGO ligado a quitosana melhora as propriedades mecânicas.

Tabela 13. Valores de módulo de elasticidade (G') e módulo de perda (G'') obtidos para os hidrogéis estudados a partir da análise de oscilação da frequência com 1 e 10 Hz.

Amostra	1 Hz		10 Hz	
	G' (kPa)	G'' (kPa)	G' (kPa)	G'' (kPa)
10% PEG-MA + 0,5% CS	24,3	$9,4 \cdot 10^{-3}$	24,2	$4,8 \cdot 10^{-2}$
	$\pm 5 \cdot 10^{-1}$	$\pm 4 \cdot 10^{-3}$	$\pm 5 \cdot 10^{-1}$	$\pm 3 \cdot 10^{-3}$
10% PEG-MA + 1% CS	12,9	$2,6 \cdot 10^{-2}$	12,8	$1,9 \cdot 10^{-2}$
	$\pm 1,3$	$\pm 8 \cdot 10^{-3}$	$\pm 1,2$	$\pm 9 \cdot 10^{-2}$
10% PEG-MA + 2% CS	9,2	$7 \cdot 10^{-3}$	9,0	$1 \cdot 10^{-3}$
	$\pm 5 \cdot 10^{-1}$	$\pm 5 \cdot 10^{-2}$	$\pm 4 \cdot 10^{-1}$	$\pm 1 \cdot 10^{-1}$
10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO (0,01% GO)	16,7	$6,0 \cdot 10^{-3}$	16,2	$2,1 \cdot 10^{-2}$
	$\pm 3,5$	$\pm 6 \cdot 10^{-3}$	$\pm 3,6$	$\pm 2 \cdot 10^{-2}$
10% PEG-MA + 1% CS-rGO (0,01% GO)	19,9	$1,3 \cdot 10^{-2}$	19,8	$3,4 \cdot 10^{-2}$
	$\pm 2,2$	$\pm 1 \cdot 10^{-2}$	$\pm 2,1$	$\pm 3 \cdot 10^{-2}$
10% PEG-MA + 2% CS-rGO (0,01% GO)	20,8	$3,0 \cdot 10^{-2}$	20,6	$6,0 \cdot 10^{-2}$
	$\pm 1,2$	$\pm 2 \cdot 10^{-2}$	$\pm 1,1$	$\pm 2 \cdot 10^{-2}$

5.3.3.3 Condutividade

As condutividades encontradas para os hidrogéis contendo diferentes concentrações de quitosana mostraram-se semelhantes estatisticamente, todas na ordem de $10^{-5} \text{ S cm}^{-1}$. Os valores mostram uma tendência de aumento com a concentração de quitosana, o qual é um polissacarídeo catiônico e pode ter influência na condutividade elétrica. A presença do rGO proporcionou uma pequena diminuição na condutividade quando comparada as dos hidrogéis de CS pura. As ligações entre as cadeias de quitosana e do óxido de grafeno reduzido diminuem a disponibilidade dos grupos funcionais da CS e causam defeitos na estrutura do rGO, o que pode levar a diminuição da condutividade. A Figura 40 mostra o gráfico de $I \times V$ para os hidrogéis de CS pura e a Figura

41 para os hidrogéis de CS-rGO. A Tabela 14 mostra os valores de condutividade encontrados para os hidrogéis através da equação da reta da região linear, utilizando a Equação 2.

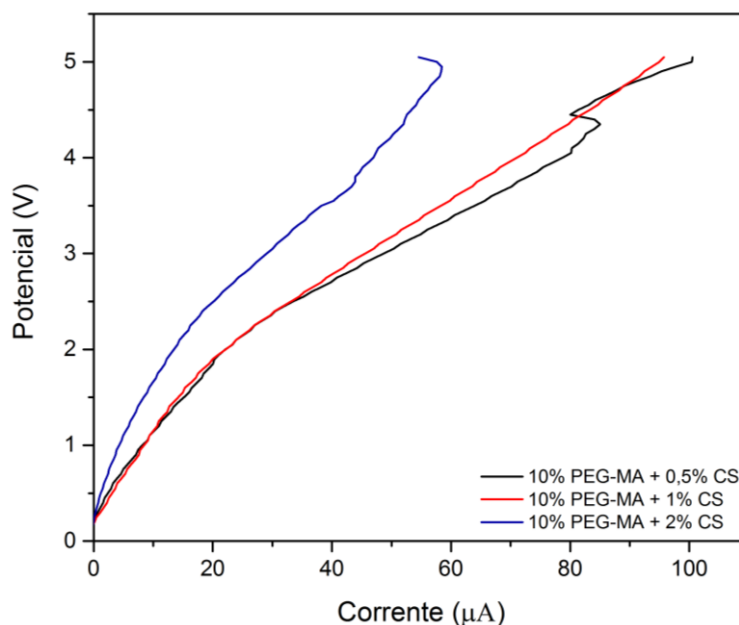


Figura 40. Gráfico da análise de condutividade elétrica para os hidrogéis de 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, 10 % PEG-MA + 1 % CS e 10 % PEG-MA + 2 % CS utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.

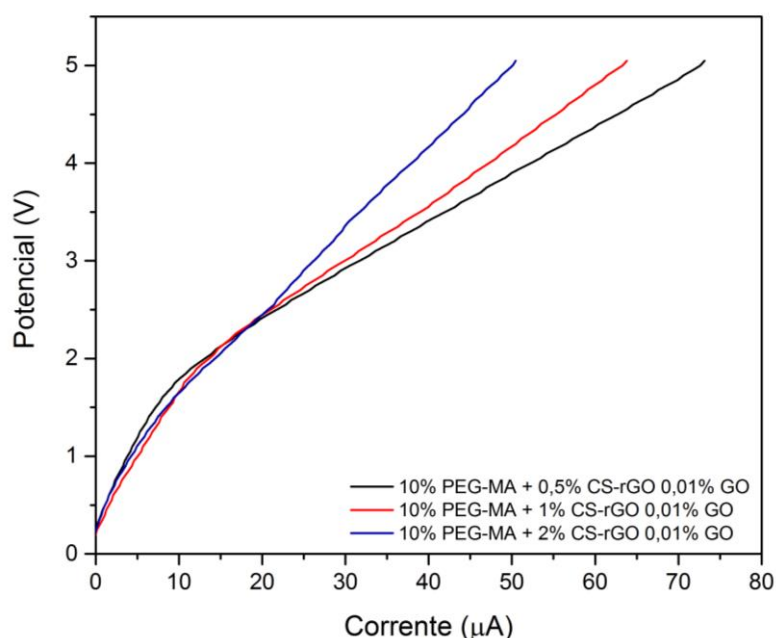


Figura 41. Gráfico da análise de condutividade elétrica para os hidrogéis de 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO, 10 % PEG-MA + 1 % CS-rGO 0,01 % GO e 10 % PEG-MA + 2 % CS-rGO 0,01 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.

Tabela 14. Valores de condutividade obtidos para os hidrogéis através da Equação 2.

Amostra	10% PEG-MA + 0,5% CS	10% PEG-MA + 1% CS	10% PEG-MA + 2% CS
σ (S cm ⁻¹)	7,18.10 ⁻⁵ ± 2,22.10 ⁻⁵	5,05.10 ⁻⁵ ± 7,74.10 ⁻⁶	3,76.10 ⁻⁵ ± 2,59.10 ⁻⁵

Amostra	10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,01% GO	10% PEG-MA + 1% CS-rGO 0,01% GO	10% PEG-MA + 2% CS-rGO 0,01% GO
σ (S cm ⁻¹)	4,53.10 ⁻⁵ ± 2,65.10 ⁻⁵	3,73.10 ⁻⁵ ± 2,95.10 ⁻⁵	2,62.10 ⁻⁵ ± 1,69.10 ⁻⁵

5.3.4 Hidrogéis contendo proporção equivalente de CS:rGO

Biomateriais com potencial aplicação como *scaffolds* à regeneração de tecido muscular necessitam de respostas específicas para que as células reconheçam e consigam criar um novo tecido. A condutividade elétrica desse tipo de material é um fator importante para essas aplicações. Portanto, o aumento da concentração de óxido de grafeno foi estudado como forma de aprimorar as propriedades de condutividade do hidrogel. Nesta investigação, foi utilizada uma proporção de 1:1 entre a quitosana e o óxido de grafeno, em uma concentração total na solução de preparação do hidrogel de 0,5 %. O método de preparação foi idêntico aos hidrogéis anteriores.

5.3.4.1 Grau de intumescimento

O gráfico do grau de intumescimento comparando os hidrogéis com 0,01 % GO e 0,5 % GO está mostrado na Figura 42. Os valores encontrados para o grau de intumescimento máximo, em 24 horas, estão na Tabela 15. Os valores do grau de intumescimento para os dois hidrogéis mostraram-se próximos. O intumescimento do hidrogel poderia ser afetado pelo aumento da concentração

de óxido de grafeno reduzido em virtude da sua hidrofobicidade, porém não causou diferença significativa no grau de intumescimento.

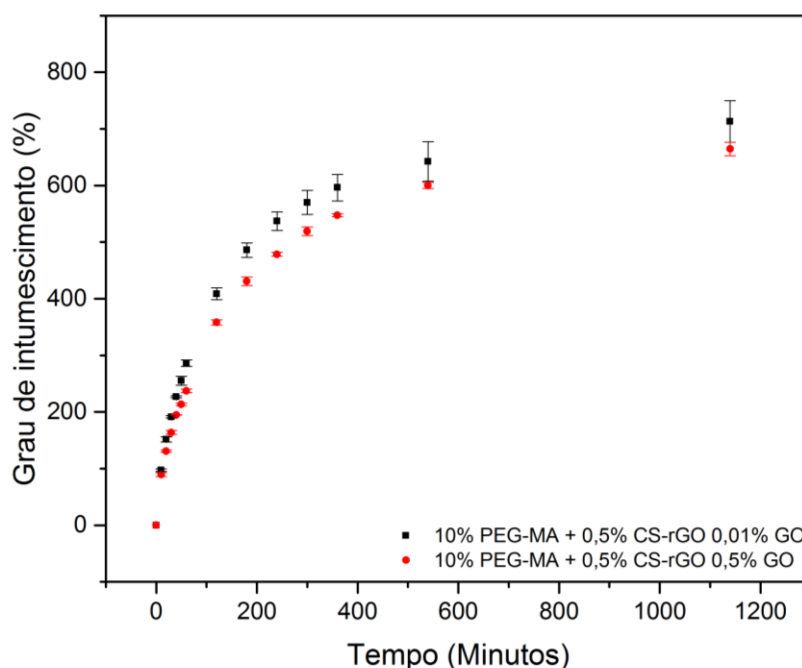


Figura 42. Gráfico do grau de intumescimento em função do tempo para os hidrogéis de 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01 % GO e 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,5 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.

Tabela 15. Valores de média e desvio padrão do grau de intumescimento máximo para os hidrogéis.

	$Q_{PPS+TEMED}$ (%)
10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,01% GO	713 ± 37
10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,5% GO	664 ± 12

5.3.4.2 Análises reológicas

A Figura 43 mostra o gráfico da análise de reologia da oscilação da frequência para o hidrogel contendo 0,5 % GO na composição. Os valores encontrados para o módulo de elasticidade (G') e de perda (G'') estão apresentados na Tabela 16.

O gráfico da oscilação da frequência mostra um alto módulo de armazenamento (G') e constante durante a análise. Os valores de G' são muito superiores aos de G'' , mostrando que o gel tem alta rigidez.

O aumento da concentração de rGO não alterou significativamente as propriedades reológicas. Os valores de módulos de elasticidade encontrados para tecido muscular nativo variam de 8 a 17 kPa¹¹², portanto, os hidrogéis contendo 0,01 % e 0,5 % GO mostraram-se adequados para tal aplicação, com 16 e 20 kPa, respectivamente.

Tabela 16. Valores de módulo de elasticidade (G') e módulo de perda (G'') obtidos para os hidrogéis estudados a partir da análise de oscilação da frequência com 1 e 10 Hz.

Amostra	1 Hz		10 Hz	
	G' (kPa)	G'' (kPa)	G' (kPa)	G'' (kPa)
10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO (0,01% GO)	16,7 ± 4	$6,0 \cdot 10^{-3}$ $\pm 6 \cdot 10^{-3}$	16,2 ± 4	$2,1 \cdot 10^{-2}$ $\pm 2 \cdot 10^{-2}$
10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO (0,5% GO)	20,3 ± 3	$2,7 \cdot 10^{-1}$ $\pm 1 \cdot 10^{-1}$	20,5 ± 3	$3,0 \cdot 10^{-1}$ $\pm 2 \cdot 10^{-1}$

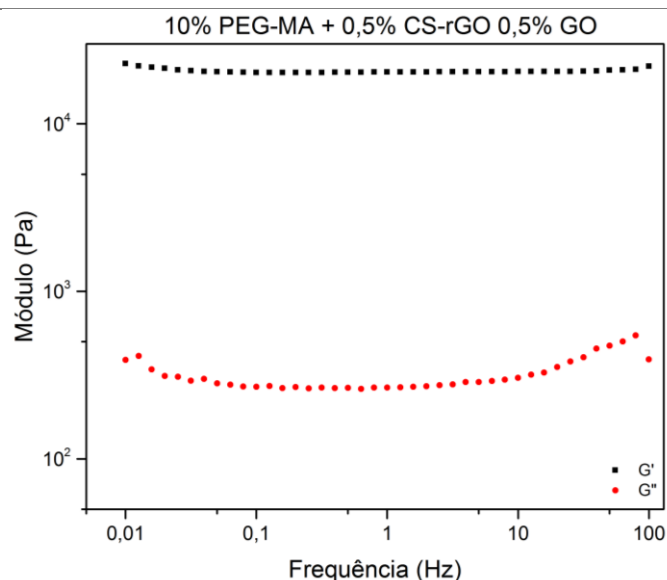


Figura 43. Gráfico de reologia obtido através da análise de oscilação da frequência para o hidrogel contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,5 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS + TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).

5.3.4.3 Condutividade

A Figura 44 mostra o gráfico de I x V para o hidrogel contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,5 % GO. A condutividade encontrada para o hidrogel contendo maior concentração de rGO foi muito semelhante aos demais. O método de redução do GO utilizando a quitosana como redutor mostrou-se eficiente, porém pode ter causado defeitos na estrutura do óxido de grafeno reduzido impedindo a condução elétrica desejada. A Tabela 17 compara os valores de condutividade encontrados para os hidrogéis contendo 0,01 e 0,5 % de GO.

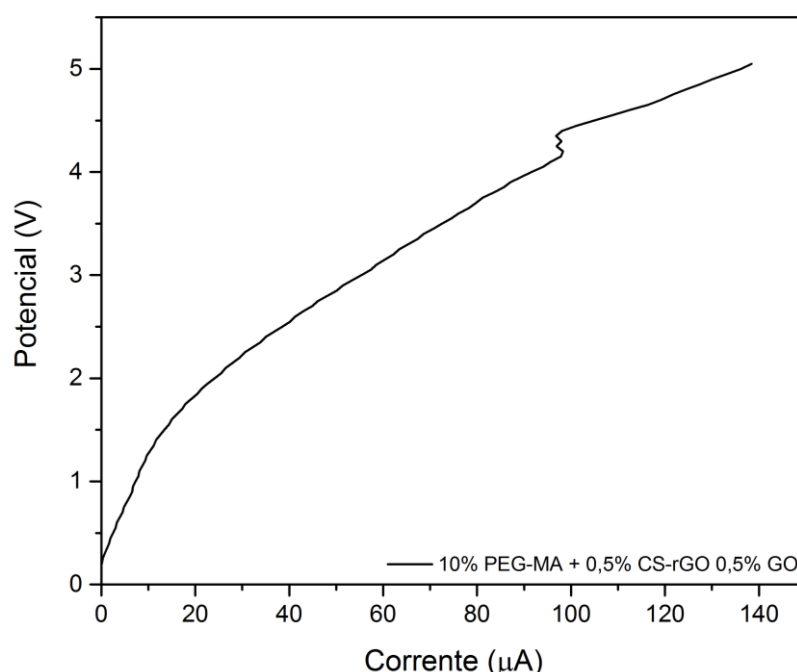


Figura 44. Gráfico da análise de condutividade elétrica para os hidrogéis de 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,5 % GO utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED.

Tabela 17. Valores de condutividade elétrica obtidos para os hidrogéis através da Equação 2.

Hidrogel	10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,01% GO	10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,5% GO
σ (S cm ⁻¹)	$4,53 \cdot 10^{-5}$ $\pm 2,65 \cdot 10^{-5}$	$7,78 \cdot 10^{-5}$ $\pm 4,67 \cdot 10^{-5}$

6. Conclusões

Hidrogéis de PEG-MA contendo CS-rGO foram preparados com êxito. Para que esse objetivo fosse atingido, primeiramente a síntese do óxido de grafeno a partir do grafite foi realizada. Em seguida, a quitosana foi funcionalizada com óxido de grafeno, causando sua redução a óxido de grafeno reduzido. A comprovação da formação do GO e da CS-rGO foi realizada através de análises de DRX e UV-Visível, onde foi possível observar, primeiramente, a oxidação e em seguida a redução causada pela reação com a quitosana. A reação de síntese da CS-rGO foi realizada com diferentes concentrações de óxido de grafeno.

A funcionalização do PEG-MA foi realizada utilizando anidrido metacrílico, de forma a obter grupos reticulantes nas extremidades do polímero. Desta forma, os hidrogéis foram formados por reações radiculares entre as ligações duplas dos grupos metacrilato utilizando como sistema de iniciadores PPS e TEMED. Ainda foram estudados hidrogéis contendo diferentes concentrações de PEG-MA e de CS.

Os estudos de grau de intumescimento mostraram valores superiores para os hidrogéis contendo óxido de grafeno reduzido, sugerindo sua interferência na reação de reticulação da quitosana. As análises reológicas mostraram que os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA e 0,5 % CS-rGO possuem propriedades mecânicas semelhantes aos encontrados em tecidos nativos musculares. Através dos resultados de grau de intumescimento e das análises reológicas foi possível propor a formação de um hidrogel IPN quando a composição envolve a quitosana pura e um hidrogel semi-IPN quando há óxido de grafeno reduzido na composição.

As análises de condutividade elétrica mostraram valores semelhantes para todos os hidrogéis estudados, sugerindo que o óxido de grafeno reduzido possui defeitos em sua estrutura que prejudicam a condução elétrica. Os hidrogéis de composição 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO foram considerados materiais com potencial para a aplicação em regeneração muscular por conter as propriedades mecânicas semelhantes às do tecido nativo. Os hidrogéis

ainda devem ser avaliados por ensaios biológicos afim de verificar a sua biocompatibilidade.

7. Referências Bibliográficas

- (1) Jana, S.; Levengood, S. K. L. L.; Zhang, M. *Adv. Mater.* **2016**, *28* (48), 10588–10612.
- (2) Corona, B. T.; Henderson, B. E. P.; Ward, C. L.; Greising, S. M. *Physiol. Rep.* **2017**, *5* (7), e13249.
- (3) Ma, J.; Baker, A. R.; Calabro, A.; Derwin, K. A. *PLoS One* **2017**, *12* (4), e0175853.
- (4) Scott, J. B.; Ward, C. L.; Corona, B. T.; Deschenes, M. R.; Harrison, B. S.; Saul, J. M.; Christ, G. J. *Front. Pharmacol.* **2017**, *7* (January), 1–16.
- (5) Ahadian, S.; Sadeghian, R. B.; Salehi, S.; Ostrovidov, S.; Bae, H.; Ramalingam, M.; Khademhosseini, A. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26* (10), 1984–2001.
- (6) Sicari, B. M.; Rubin, J. P.; Dearth, C. L.; Wolf, M. T.; Ambrosio, F.; Boninger, M.; Turner, N. J.; Weber, D. J.; Simpson, T. W.; Wyse, A.; Brown, E. H. P.; Dziki, J. L.; Fisher, L. E.; Brown, S.; Badylak, S. F. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6* (234), 234ra58-234ra58.
- (7) Wolf, M. T.; Dearth, C. L.; Sonnenberg, S. B.; Lobo, E. G.; Badylak, S. F. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *84*, 208–221.
- (8) Celikkin, N.; Rinoldi, C.; Costantini, M.; Trombetta, M.; Rainer, A.; Wojciech, Ś. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *78*, 1277–1299.
- (9) Weinberger, F.; Mannhardt, I.; Eschenhagen, T. *Am. Hear. Assoc.* **2017**, 1487–1501.
- (10) Smith, B. D.; Grande, D. A. *Nat. Publ. Gr.* **2015**, *11* (4), 213–222.
- (11) Ma, X.; Ge, J.; Li, Y.; Guo, B.; Ma, P. X. *RSC Adv.* **2014**, *4* (26), 13652–13661.
- (12) Noh, S.; Myung, N.; Park, M.; Kim, S.; Zhang, S.-U.; Kang, H.-W. In *Clinical Regenerative Medicine in Urology*; Springer Singapore: Singapore, 2018; pp 105–123.
- (13) Williams, D. F. *Definitions in biomaterial. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*; Elsevier, 1987, 1987.
- (14) Hsu, S.-H.; Hung, K.-C.; Chen, C.-W. *J. Name* **2016**, *4* (1), 1–178.

- (15) Zhang, R.; Ma, P. X. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *45* (4), 285–293.
- (16) Singh, M.; Morris, C. P.; Ellis, R. J.; Detamore, M. S.; Berkland, C. *Tissue Eng. Part C Methods* **2008**, *14* (4), 299–309.
- (17) Berndt, P.; Fields, G. B.; Tirrell, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (37), 9515–9522.
- (18) Cabodi, M.; Choi, N. W.; Gleghorn, J. P.; Lee, C. S. D.; Bonassar, L. J.; Stroock, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (40), 13788–13789.
- (19) Dhandayuthapani, B.; Yoshida, Y.; Maekawa, T.; Kumar, D. S. *Int. J. Polym. Sci.* **2011**, *2011*, 1–19.
- (20) Hsu, S.-H.; Hung, K.-C.; Chen, C.-W. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (1), 1–178.
- (21) Wang, X.; Hao, T.; Qu, J.; Wang, C.; Chen, H. *J. Nanomater.* **2015**, *2015*.
- (22) Li, Y.; Wang, X.; Wei, Y.; Tao, L. *Chinese Chem. Lett.* **2017**, *28* (11), 2053–2057.
- (23) Venugopal, J. R.; Prabhakaran, M. P.; Mukherjee, S.; Ravichandran, R.; Dan, K.; Ramakrishna, S. *J. R. Soc. Interface* **2012**, *9* (66), 1–19.
- (24) WICHTERLE, O.; LÍM, D. *Nature* **1960**, *185* (4706), 117–118.
- (25) Kiyozumi, T.; Kanatani, Y.; Ishihara, M.; Saitoh, D.; Shimizu, J.; Yura, H.; Suzuki, S.; Okada, Y.; Kikuchi, M. *Burns* **2007**, *33* (5), 642–648.
- (26) Sorbara, L.; Jones, L.; Williams-Lyn, D. *Contact Lens Anterior Eye* **2009**, *32* (2), 93–96.
- (27) Narita, A.; Takahara, M.; Ogino, T.; Fukushima, S.; Kimura, Y.; Tabata, Y. *Knee* **2009**, *16* (4), 285–289.
- (28) Huang, L.-Y.; Yang, M.-C. *J. Magn. Magn. Mater.* **2007**, *310* (2), 2874–2876.
- (29) Bassil, M.; Davenas, J.; EL Tahchi, M. *Sensors Actuators B Chem.* **2008**, *134* (2), 496–501.
- (30) Zhang, L.; Rakotondradany, F.; Myles, A. J.; Fenniri, H.; Webster, T. J. *Biomaterials* **2009**, *30* (7), 1309–1320.
- (31) Leone, G.; Delfini, M.; Di Cocco, M. E.; Borioni, A.; Barbucci, R. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343* (2), 317–327.
- (32) Cassano, R.; Trombino, S.; Muzzalupo, R.; Tavano, L.; Picci, N. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *72* (1), 232–238.
- (33) Kirschner, C. M.; Anseth, K. S. *Acta Mater.* **2013**, *61* (3), 931–944.

- (34) Demitri, C.; Scalera, F.; Madaghiele, M.; Sannino, A.; Maffezzoli, A. *Int. J. Polym. Sci.* **2013**, *2013*, 1–6.
- (35) Sannino, A.; Demitri, C.; Madaghiele, M. *Materials (Basel)*. **2009**, *2* (2), 353–373.
- (36) Annabi, N.; Nichol, J. W.; Zhong, X.; Ji, C.; Koshy, S.; Khademhosseini, A.; Dehghani, F. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2010**, *16* (4), 371–383.
- (37) Zuidema, J. M.; Rivet, C. J.; Gilbert, R. J.; Morrison, F. A. **2013**, 1063–1073.
- (38) Barbucci, R. *Hydrogels - Biological Properties and Applications*; Springer Milan: Milano, 2009.
- (39) Hoffman, A. S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54* (1), 3–12.
- (40) Bae, K. H.; Wang, L.-S.; Kurisawa, M. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (40), 5371.
- (41) Ottenbrite, R. M.; Park, K.; Okano, T. *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*; Ottenbrite, R. M., Park, K., Okano, T., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2010.
- (42) Kharkar, P. M.; Kiick, K. L.; Kloxin, A. M. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (17), 7335–7372.
- (43) B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. L. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials*; Elsevier, 2013.
- (44) Aouada, A. F.; Mattoso, L. H. C. *Bol. Pesqui. e Desenvol.* **2009**, *28*, 32.
- (45) Ahmed, E. M. *J. Adv. Res.* **2015**, *6* (2), 105–121.
- (46) Lohani, A.; Singh, G.; Bhattacharya, S. S.; Verma, A. *J. Drug Deliv.* **2014**, *2014*, 1–11.
- (47) Hoare, T. R.; Kohane, D. S. *Polymer (Guildf)*. **2008**, *49* (8), 1993–2007.
- (48) Ullah, F.; Othman, M. B. H.; Javed, F.; Ahmad, Z.; Akil, H. M. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *57*, 414–433.
- (49) Rahimi, N.; Molin, D. G.; Cleij, T. J.; van Zandvoort, M. A.; Post, M. J. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (5), 1448–1457.
- (50) Gulerz, S. K. H.; Al-Assaf, S.; Phillips, G. O. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*; Carpi, A., Ed.; InTech, 2011.
- (51) H. Gulrez, S. K.; Al-Assaf, S.; O, G. In *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to*

Technology Applications; InTech, 2011.

- (52) Davidovich-Pinhas, M.; Bianco-Peled, H. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *79* (4), 1020–1027.
- (53) Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57* (1), 19–34.
- (54) Reis, E. F. dos; Campos, F. S.; Lage, A. P.; Leite, R. C.; Heneine, L. G.; Vasconcelos, W. L.; Lobato, Z. I. P.; Mansur, H. S. *Mater. Res.* **2006**, *9* (2), 185–191.
- (55) Sivashanmugam, A.; Arun Kumar, R.; Vishnu Priya, M.; Nair, S. V.; Jayakumar, R. *Eur. Polym. J.* **2015**, *72*, 543–565.
- (56) Li, Jun; Osada, Y. *Functional Hydrogels as Biomaterials*; Li, J., Osada, Y., Cooper-White, J., Eds.; Springer Series in Biomaterials Science and Engineering; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2018; Vol. 12.
- (57) Chandra, R.; Rustgi, R. *Prog. Polym. Sci.* **1998**, *23* (97), 1273–1335.
- (58) Franchetti, S. M. M.; Marconato, J. C. *Quim. Nova* **2006**, *29* (4), 811–816.
- (59) A. K. Mohanty, M. Misra, and L. T. D. *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*; Mohanty, A., Misra, M., Drzal, L., Eds.; CRC Press, 2005.
- (60) Yadav, P. *J. Clin. DIAGNOSTIC Res.* **2015**.
- (61) Wallace, D. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55* (12), 1631–1649.
- (62) Richter, C.; Reinhardt, M.; Giselbrecht, S.; Leisen, D.; Trouillet, V.; Truckenmüller, R.; Blau, A.; Ziegler, C.; Welle, A. *Biomed. Microdevices* **2010**, *12* (5), 787–795.
- (63) Ouwerx, C.; Velings, N.; Mestdagh, M. .; Axelos, M. A. . *Polym. Gels Networks* **1998**, *6* (5), 393–408.
- (64) Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; Schacht, E. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (5), 1387–1408.
- (65) Riva, R.; Ragelle, H.; des Rieux, A.; Duhem, N.; Jérôme, C.; Prétat, V. In *Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering*; 2011; pp 19–44.
- (66) Devolder, R.; Kong, H. J. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2012**, *4* (4), 351–365.
- (67) Rudall, B. Y. K. M.; Kenchington, W. *BioL Rev.* **1973**.
- (68) Yao, K.; Peng, T.; Yin, Y. *J. Macromol. Sci. Part C* No. June 2013, 37–41.

- (69) Signini, R. *Polímeros Ciência e Tecnol.* **2001**, *11*, 169–173.
- (70) Ravi Kumar, M. N. . *React. Funct. Polym.* **2000**, *46* (1), 1–27.
- (71) Poon, Y. F.; Cao, Y.; Liu, Y.; Chan, V.; Chan-Park, M. B. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2* (7), 2012–2025.
- (72) Li, J.; Shu, Y.; Hao, T.; Wang, Y.; Qian, Y.; Duan, C.; Sun, H.; Lin, Q.; Wang, C. *Biomaterials* **2013**, *34* (36), 9071–9081.
- (73) Depan, D.; Girase, B.; Shah, J. S.; Misra, R. D. K. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (9), 3432–3445.
- (74) Pollot, B. E.; Rathbone, C. R.; Wenke, J. C.; Guda, T. **2017**, *0075*, 672–679.
- (75) Jing, X.; Mi, H. Y.; Napiwocki, B. N.; Peng, X. F.; Turng, L. S. *Carbon N. Y.* **2017**, *125*, 557–570.
- (76) Zhu, J. *Biomaterials* **2010**, *31* (17), 4639–4656.
- (77) Guo, P.; Yuan, Y.; Chi, F. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *42*, 622–628.
- (78) Faturechi, R.; Karimi, A.; Hashemi, A.; Yousefi, H.; Navidbakhsh, M. *Adv. Polym. Technol.* **2015**, *34* (2), n/a-n/a.
- (79) Zhang, L.; Zheng, G.-J.; Guo, Y.-T.; Zhou, L.; Du, J.; He, H. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2014**, *7* (2), 136–140.
- (80) Kumar, A.; Han, S. S. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2017**, *66* (4), 159–182.
- (81) Knight, T. A.; Payne, R. G. 2013; pp 179–188.
- (82) Grémare, A.; Guduric, V.; Bareille, R.; Heroguez, V.; Latour, S.; L'heureux, N.; Fricain, J.-C.; Catros, S.; Le Nihouannen, D. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2018**, *106* (4), 887–894.
- (83) Navaei, A.; Truong, D.; Heffernan, J.; Cutts, J.; Brafman, D.; Sirianni, R. W.; Vernon, B.; Nikkhah, M. *Acta Biomater.* **2016**, *32*, 10–23.
- (84) Chandy, T.; Rao, G. H. R.; Wilson, R. F.; Das, G. S. *J. Biomater. Appl.* **2003**, *17* (4), 287–301.
- (85) Jeon, O.; Samorezov, J. E.; Alsberg, E. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (1), 47–55.
- (86) Chang, F.-C.; Tsao, C.-T.; Lin, A.; Zhang, M.; Levengood, S.; Zhang, M. *Polymers (Basel)*. **2016**, *8* (4), 112.
- (87) Van, T. D.; Tran, N. Q.; Nguyen, D. H.; Nguyen, C. K.; Tran, D. L.; Nguyen, P. T. *J. Electron. Mater.* **2016**, *45* (5), 2415–2422.

- (88) Sargeant, T. D.; Desai, A. P.; Banerjee, S.; Agawu, A.; Stopek, J. B. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (1), 124–132.
- (89) Rangel-Argote, M.; Claudio-Rizo, J. A.; Mata-Mata, J. L.; Mendoza-Novelo, B. *ACS Appl. Bio Mater.* **2018**, *1* (5), 1215–1228.
- (90) Bitounis, D.; Ali-Boucetta, H.; Hong, B. H.; Min, D. H.; Kostarelos, K. *Adv. Mater.* **2013**, *25* (16), 2258–2268.
- (91) Goenka, S.; Sant, V.; Sant, S. *J. Control. Release* **2014**, *173* (1), 75–88.
- (92) Chen, K.; Ling, Y.; Cao, C.; Li, X.; Chen, X.; Wang, X. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *69*, 1222–1228.
- (93) Kim, S.; Yoo, Y.; Kim, H.; Lee, E.; Young Lee, J. *Nanotechnology* **2015**, *26* (40), 405602.
- (94) Jo, H.; Sim, M.; Kim, S.; Yang, S.; Yoo, Y.; Park, J.-H.; Ho Yoon, T.; Kim, M.-G.; Young Lee, J. *Acta Biomater.* **2016**.
- (95) Brodie, B. C. *Philos. Trans. R. Soc. London* **1859**, *149*, 249–259.
- (96) Hummers, W. S.; Offeman, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80* (6), 1339–1339.
- (97) Justin, R.; Chen, B. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *34* (1), 50–53.
- (98) Zhou, Y.; Bao, Q.; Tang, L. A. L.; Zhong, Y.; Loh, K. P. *Chem. Mater.* **2009**, *21* (13), 2950–2956.
- (99) Jo, H.; Sim, M.; Kim, S.; Yang, S.; Yoo, Y.; Park, J. H.; Yoon, T. H.; Kim, M. G.; Lee, J. Y. *Acta Biomater.* **2017**, *48*, 100–109.
- (100) Sayyar, S.; Murray, E.; Thompson, B. C.; Chung, J.; Officer, D. L.; Gambhir, S.; Spinks, G. M.; Wallace, G. G. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (3), 481–490.
- (101) G. Mezger, T. *Applied Rheology*, 4th ed.; Anton Paar GmbH: Graz, 2017.
- (102) Mendieta-taboada, O. *Quim. Nov.* **2008**, *31* (2), 384–393.
- (103) SCHRAMM, G. *Reologia e Reometria: Fundamentos teóricos e práticos.*, 1st ed.; ARTLIBER EDITORA LTDA: São Paulo, 2006.
- (104) WALTER, R. H. *Polysaccharide Dispersions*; Elsevier: San Diego, 1998.
- (105) Rao, M. A. *Rheology of Fluid and Semisolid Foods*; Food Engineering Series; Springer US: Boston, MA, 2007.
- (106) Lin-Gibson, S.; Bencherif, S.; Cooper, J. A.; Wetzel, S. J.; Antonucci, J. M.; Vogel, B. M.; Horkay, F.; Washburn, N. R. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (4), 1280–1287.

- (107) Marcano, D. C.; Kosynkin, D. V.; Berlin, J. M.; Sinitskii, A.; Sun, Z.; Slesarev, A.; Alemany, L. B.; Lu, W.; Tour, J. M. *ACS Nano* **2010**, *4* (8), 4806–4814.
- (108) Guo, Z.; Li, D. di; Luo, X. ke; Li, Y. hui; Zhao, Q. N.; Li, M. meng; Zhao, Y. ting; Sun, T. shuai; Ma, C. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *490*, 11–22.
- (109) Hao, J.-Q.; Li, H.; Woo, H.-G. *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *112* (5), 2976–2980.
- (110) Ta, B. *Polym. Adv. Technol.* **2017**, No. 13.
- (111) Wingfield, P. In *Current Protocols in Protein Science*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1998; p A.3F.1-A.3F.8.
- (112) Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E. *Cell* **2006**, *126* (4), 677–689.
- (113) Santos, J. E. dos; Soares, J. da P.; Dockal, E. R.; Campana Filho, S. P.; Cavalheiro, É. T. G. *Polímeros* **2003**, *13* (4), 242–249.
- (114) Kim, B.-S.; Mather, P. T. *Macromolecules* **2002**, *35* (22), 8378–8384.

8. APÊNDICE

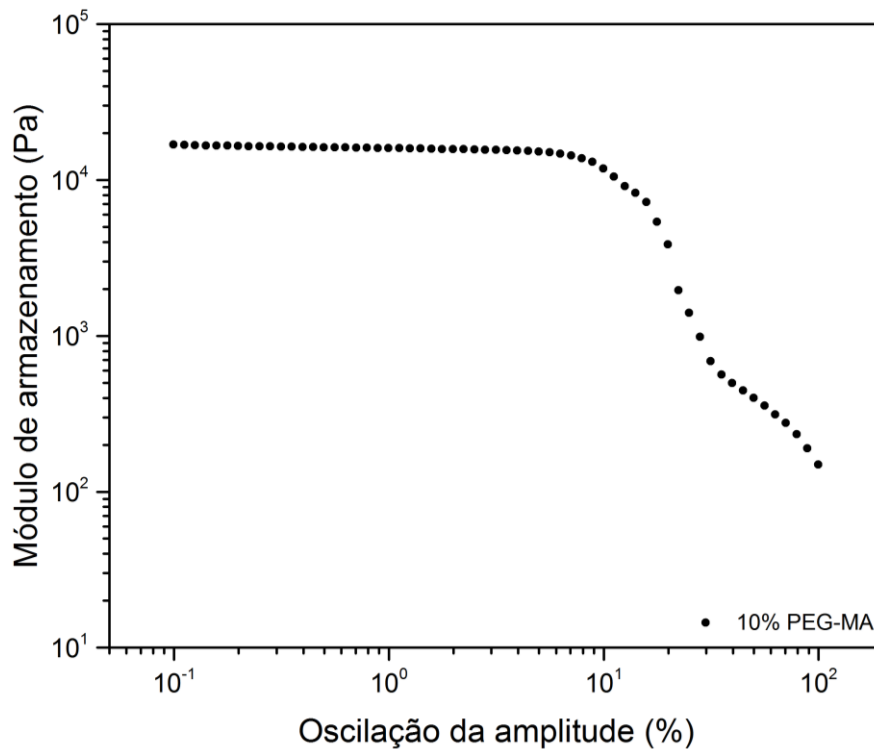


Figura 45. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10% PEG-MA utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.

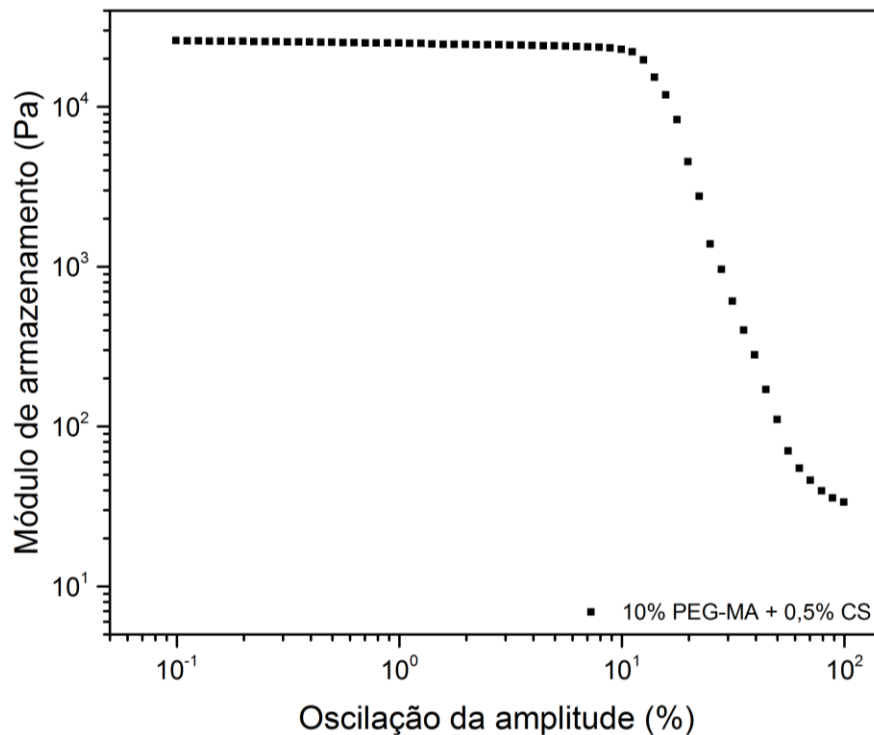


Figura 46. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 %

CS, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.

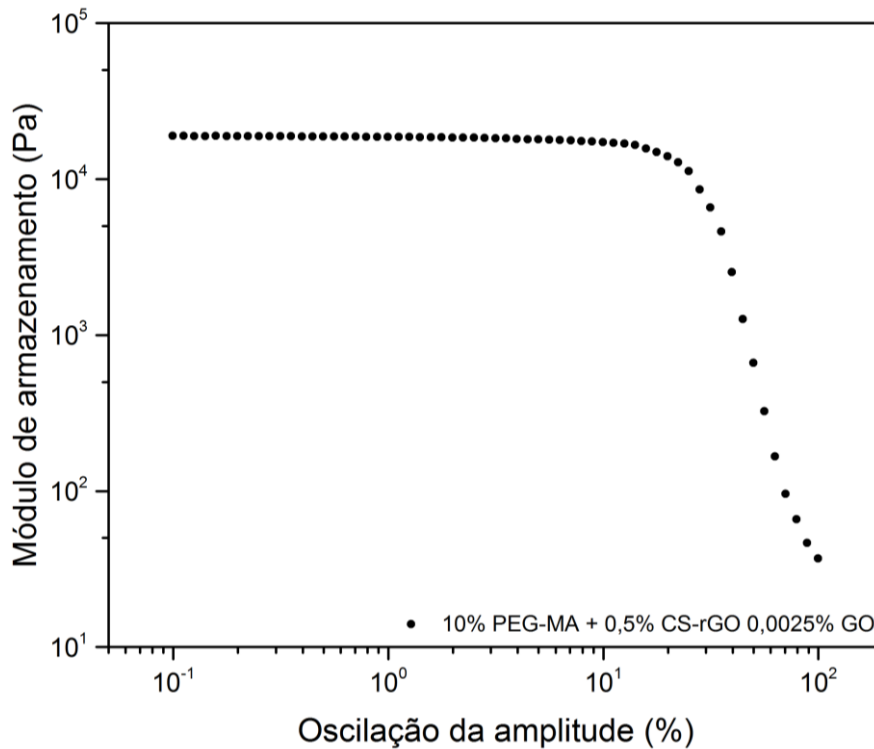


Figura 47. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.

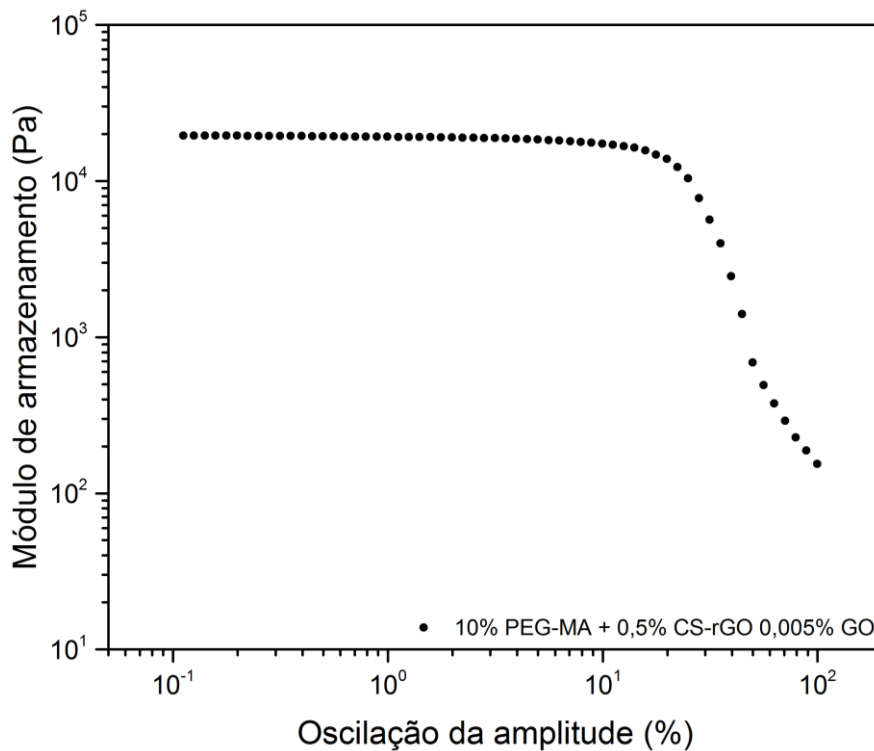


Figura 48. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 %

CS-rGO 0,005 % GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.

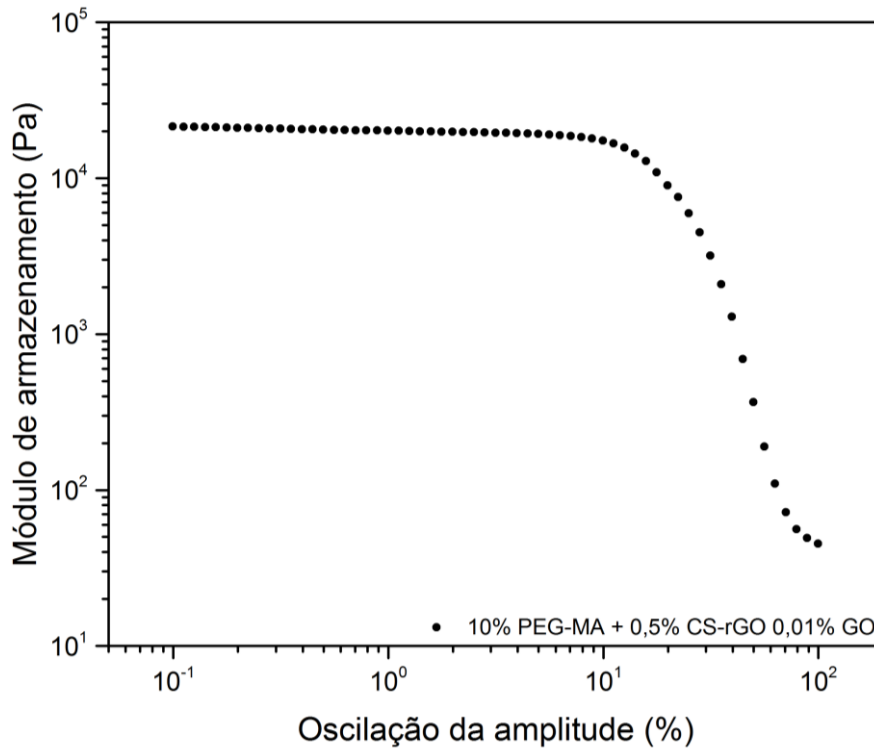


Figura 49. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.

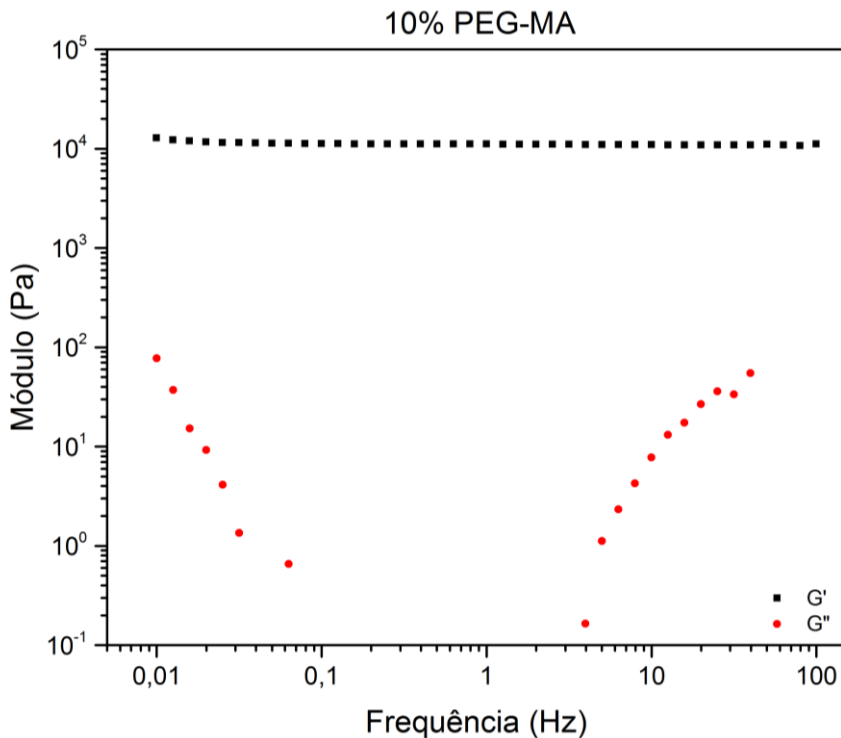


Figura 50. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10% PEG-MA, utilizando o sistema de

iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).

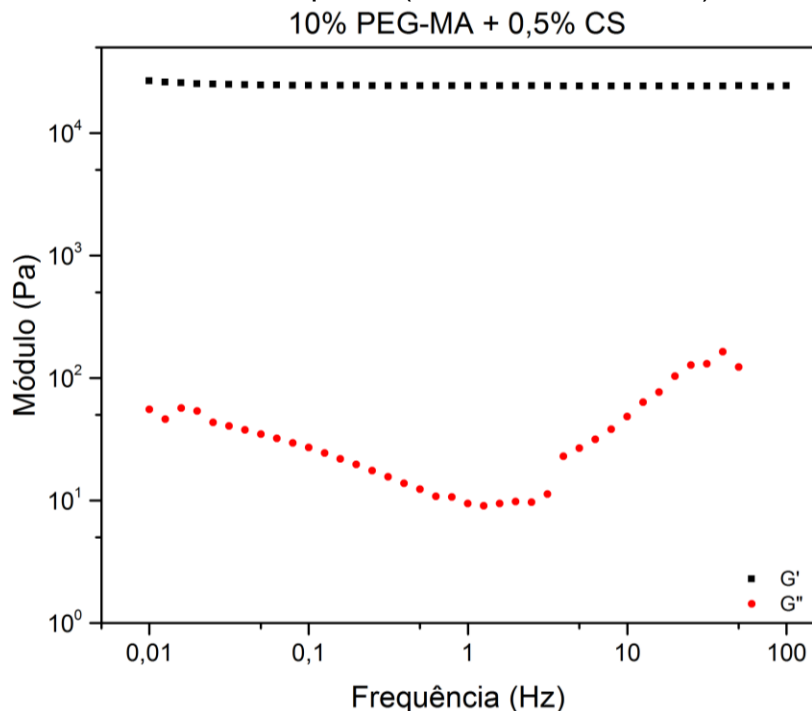


Figura 51. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).

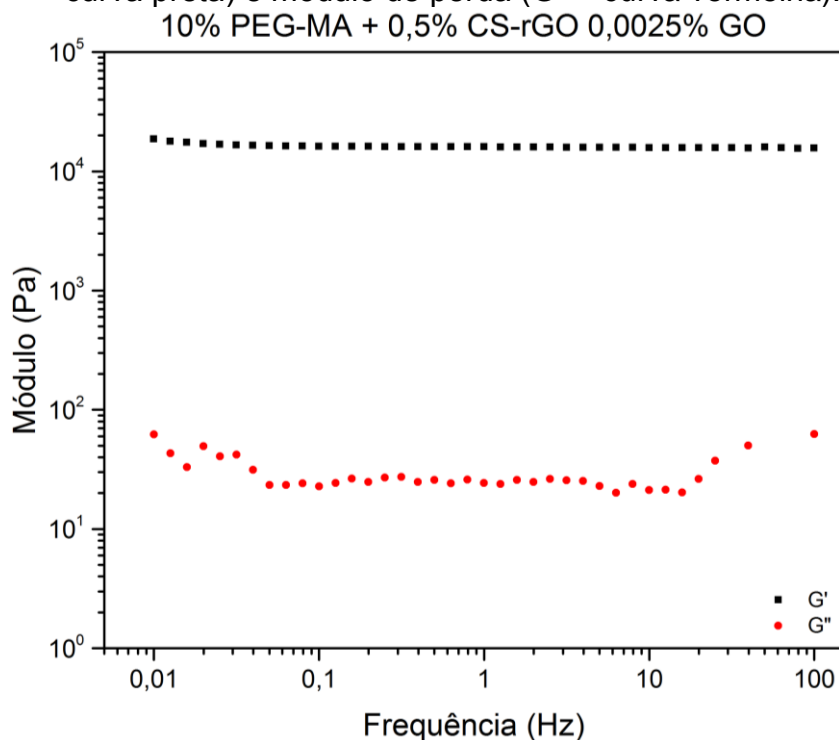


Figura 52. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a

37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).

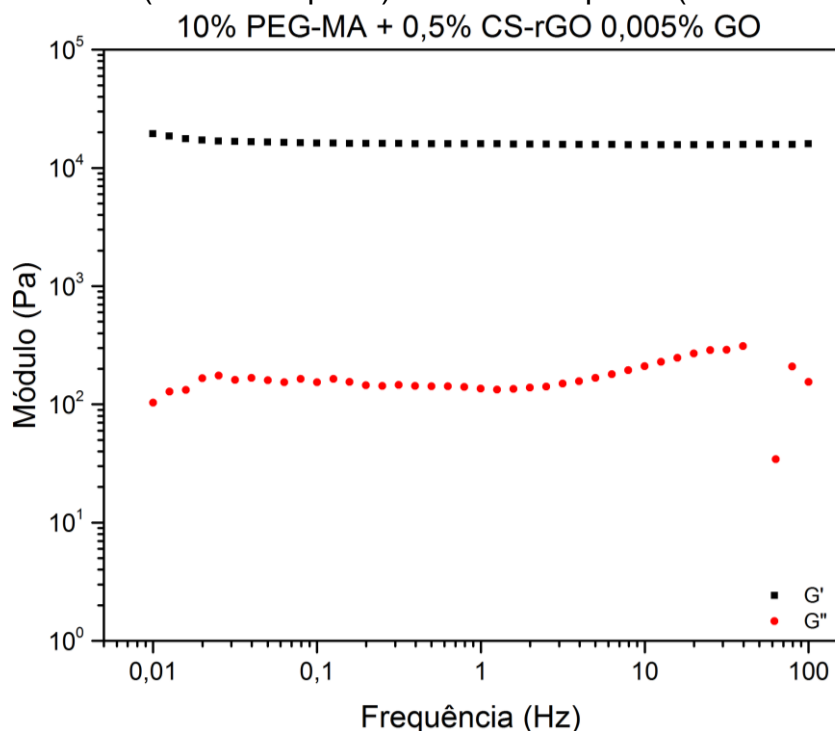


Figura 53. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).

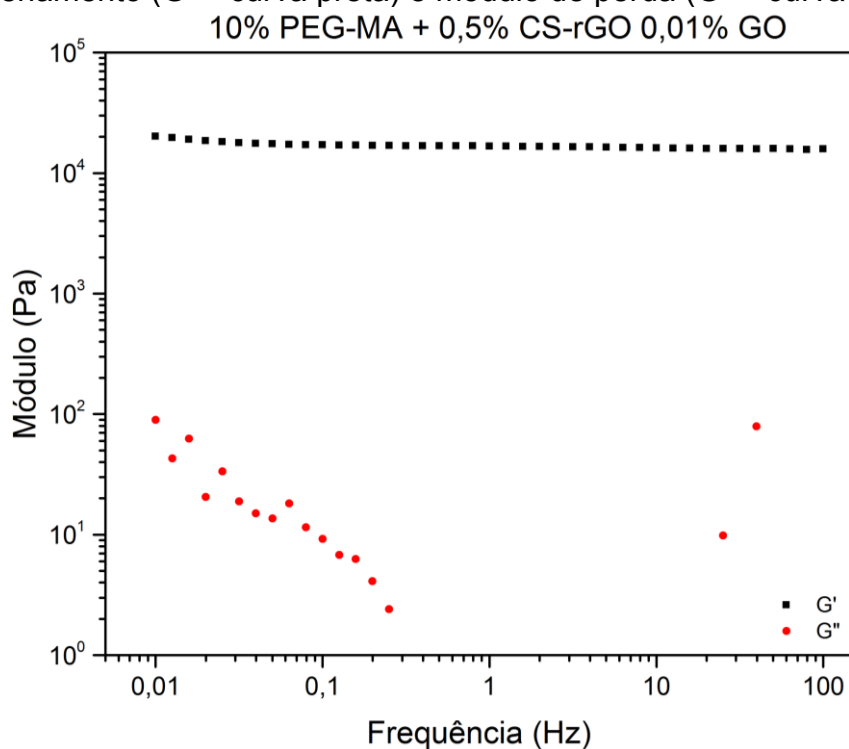


Figura 54. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37

°C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).

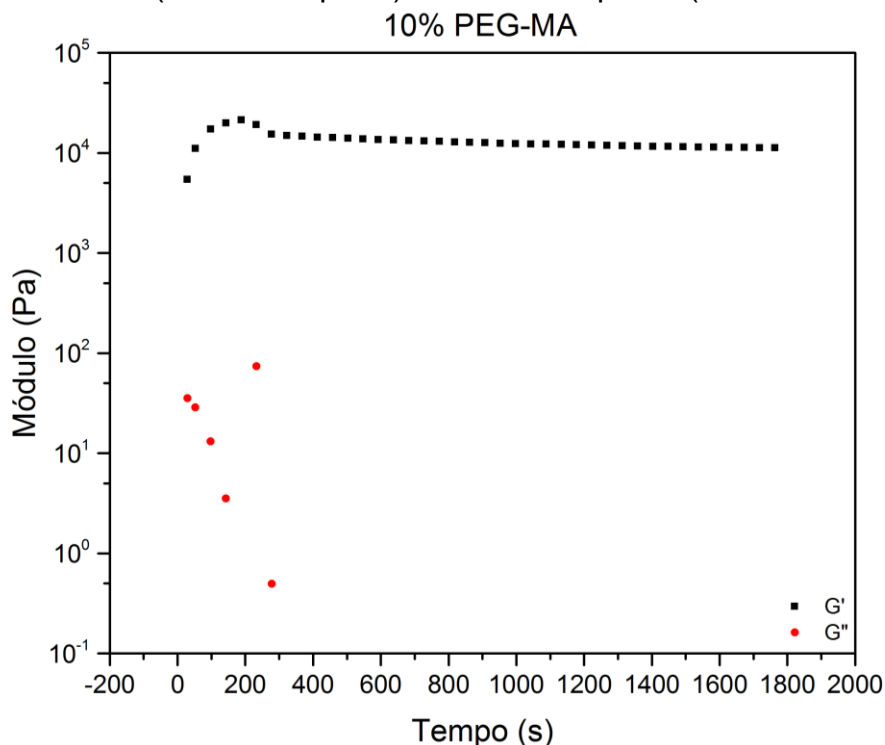


Figura 55. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10% PEG-MA, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (10 mmol L^{-1}). Análise realizada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.

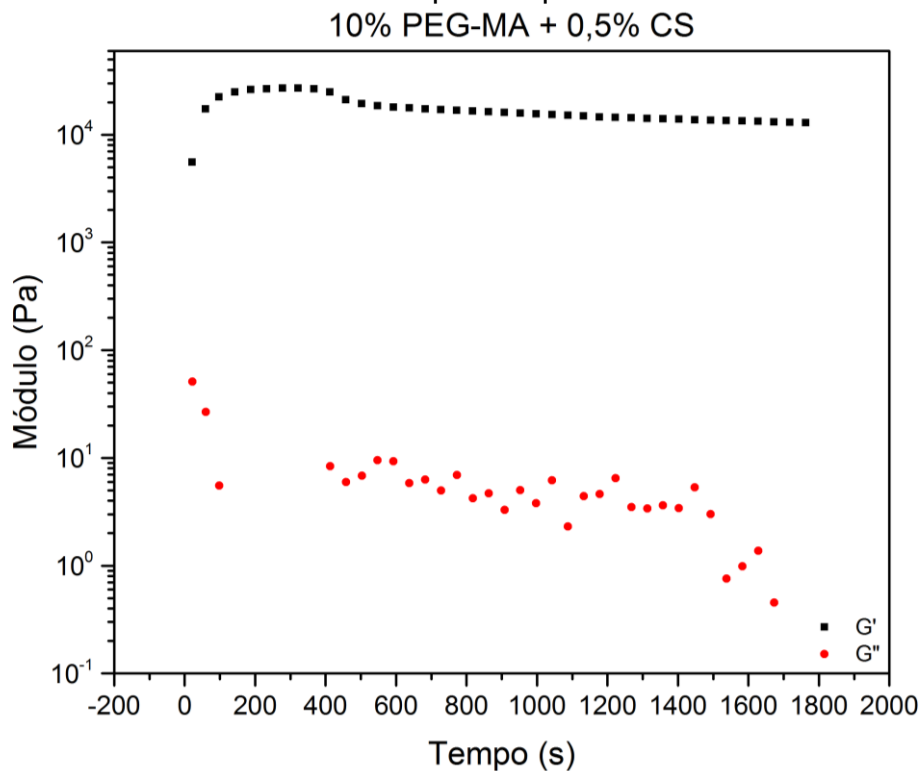


Figura 56. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10 % PEG-MA + 0,5 % CS, utilizando o sistema de

iniciadores PPS e TEMED (10 mmol L⁻¹). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.

10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,0025% GO

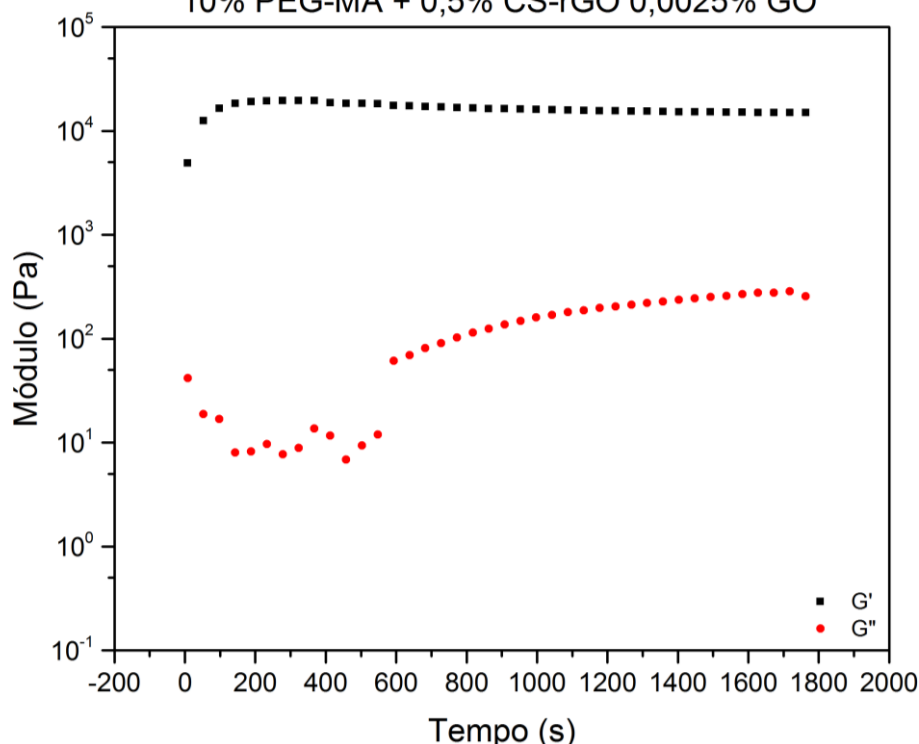


Figura 57. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (10 mmol L⁻¹). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.

10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,005% GO

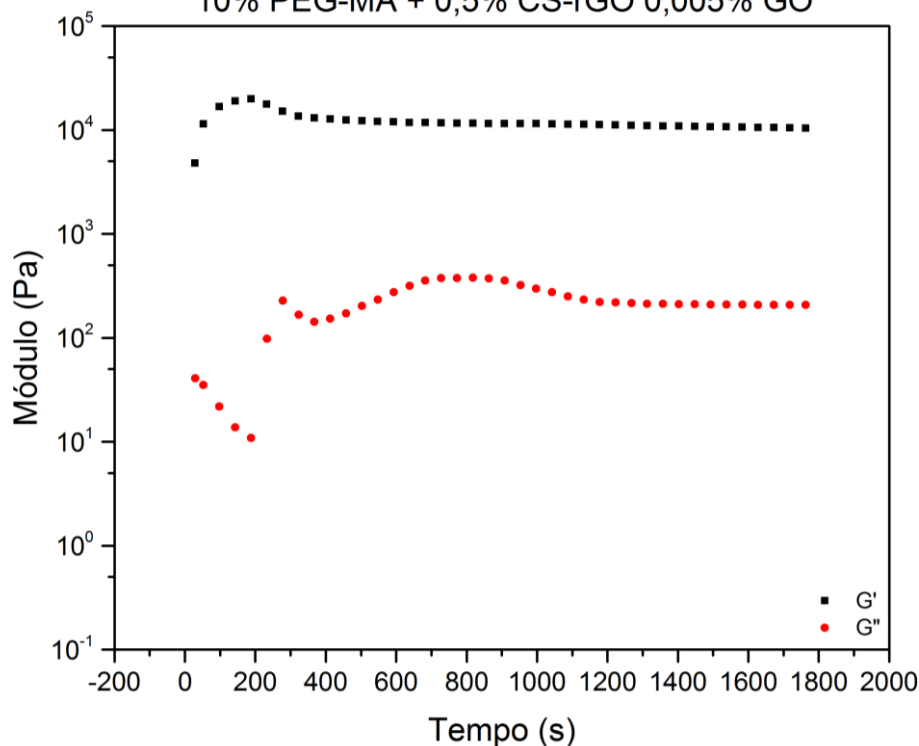


Figura 58. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO,

utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (10 mmol L^{-1}). Análise realizada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.

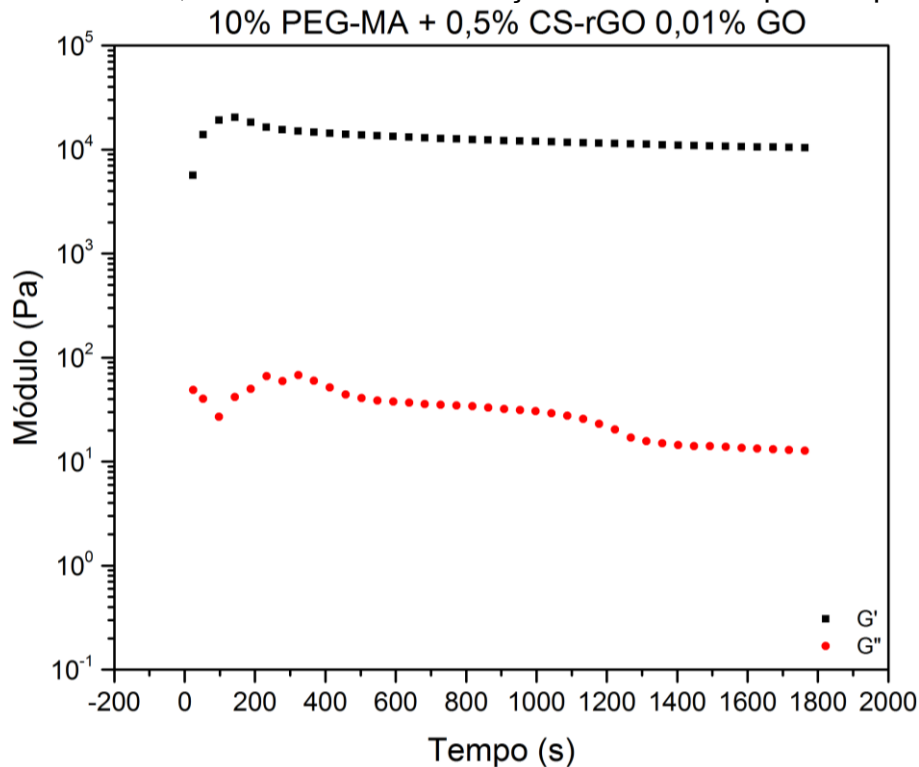


Figura 59. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (10 mmol L^{-1}). Análise realizada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.

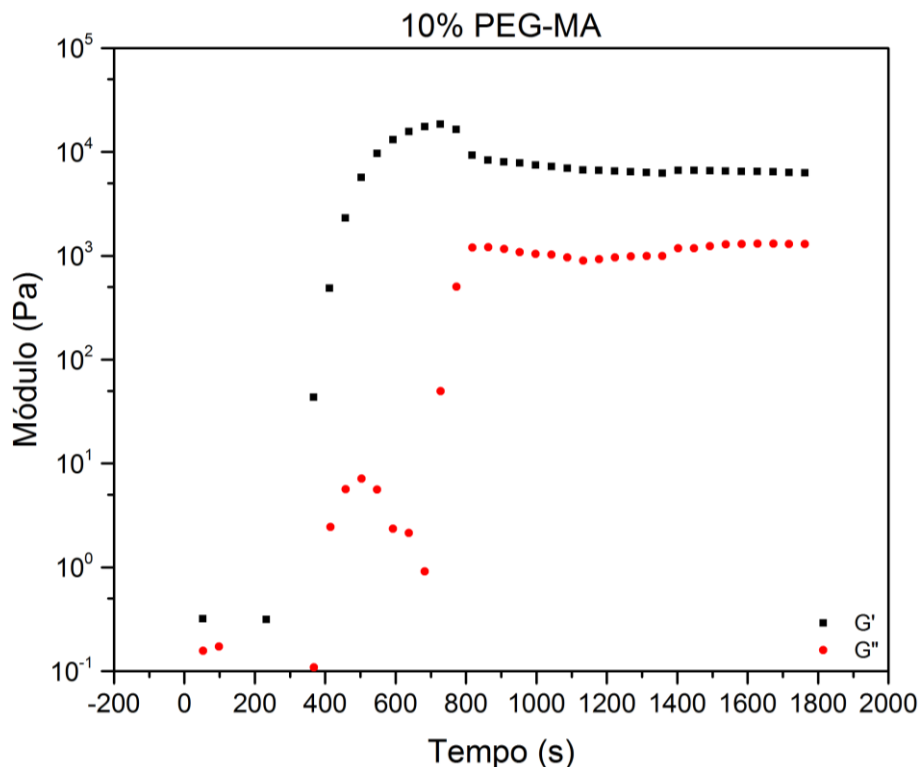


Figura 60. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10% PEG-MA, utilizando o sistema de iniciadores PPS

e TEMED (1 mmol L⁻¹). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.

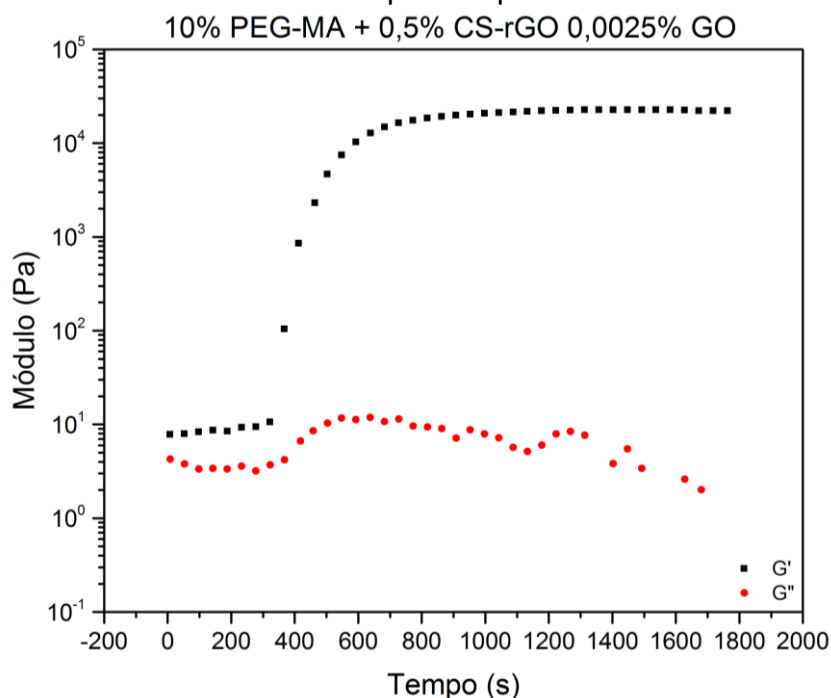


Figura 61. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,0025 % GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (1 mmol L⁻¹). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.

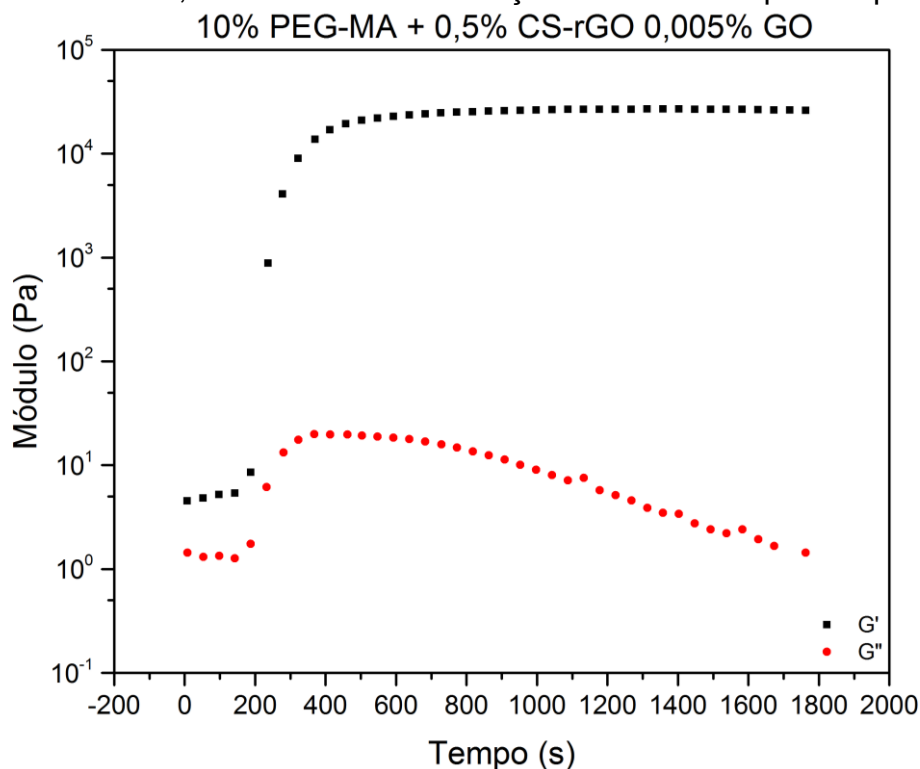


Figura 62. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,005 % GO,

utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (1 mmol L⁻¹). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.
 10% PEG-MA + 0,5% CS-rGO 0,01% GO

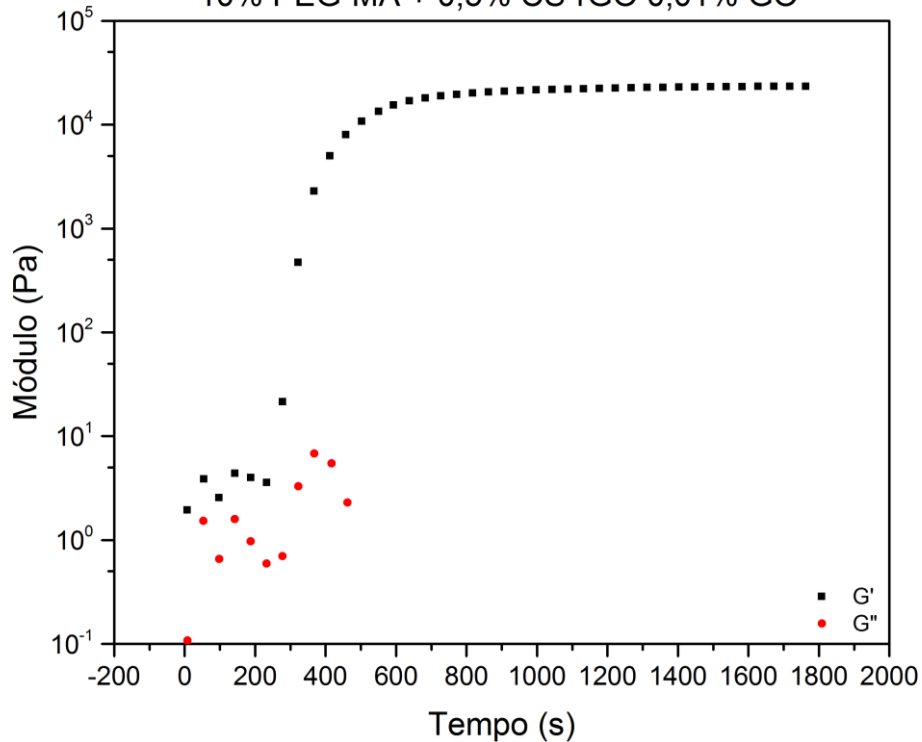


Figura 63. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação do tempo para os hidrogéis 10 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED (1 mmol L⁻¹). Análise realizada a 37 °C, com 10 % de deformação e 1 Hz de frequência por 1800s.

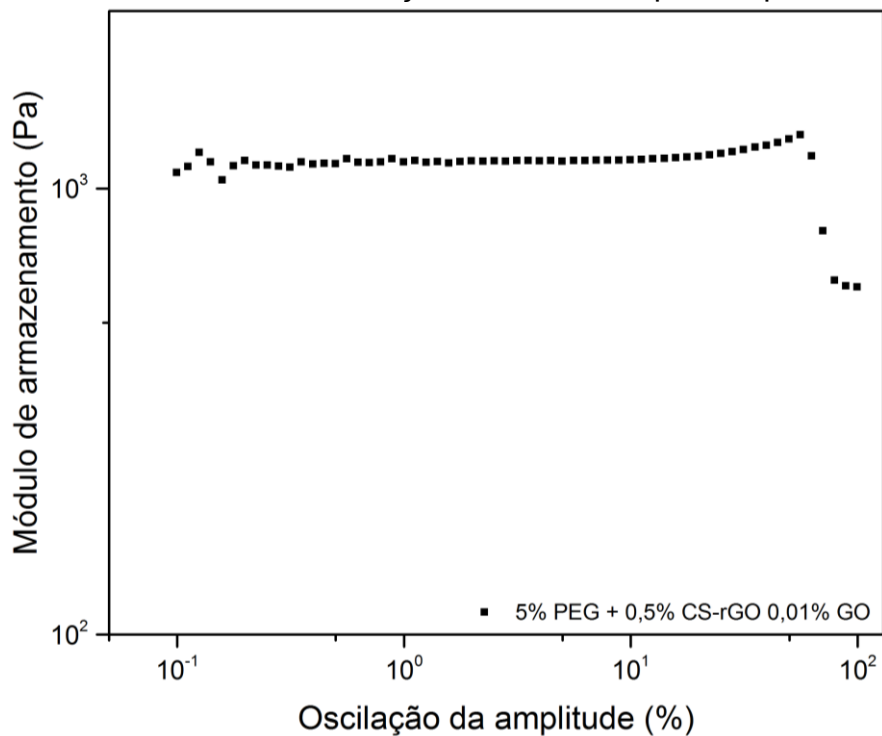


Figura 64. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 5 % PEG-MA + 0,5 %

CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.

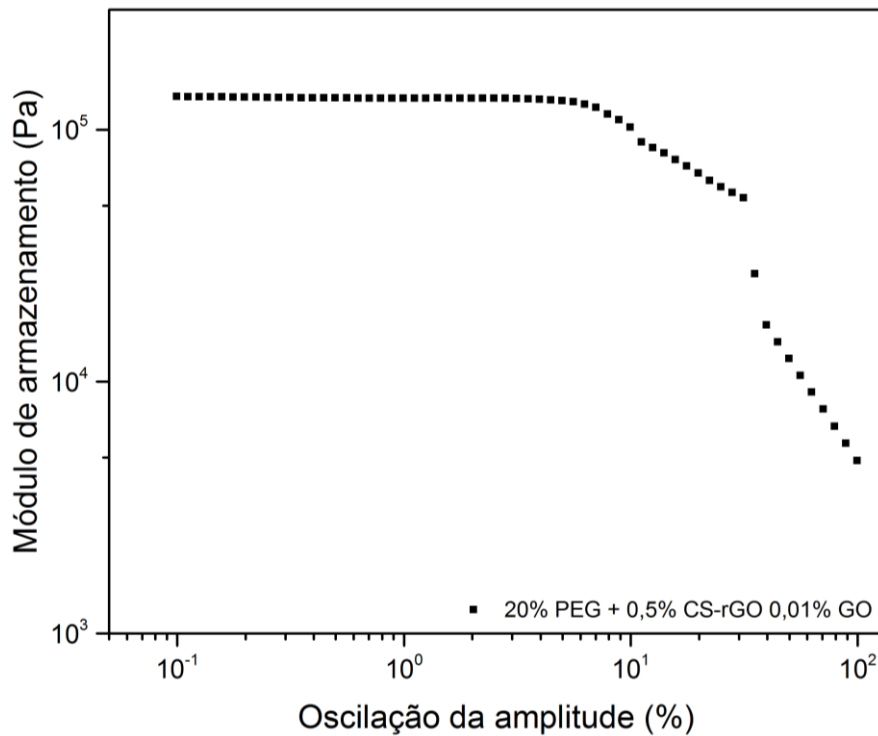


Figura 65. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 20 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.

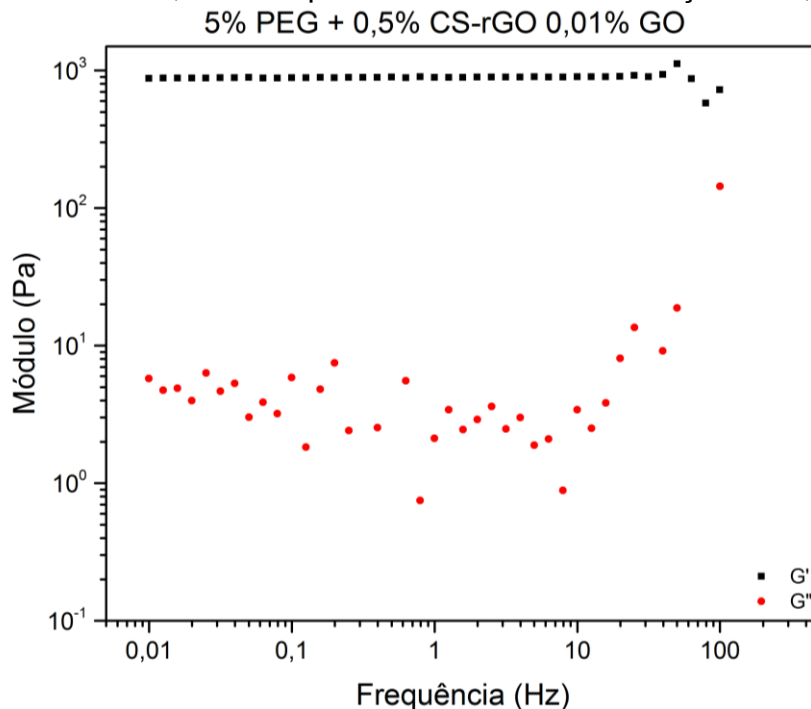


Figura 66. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 5 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).

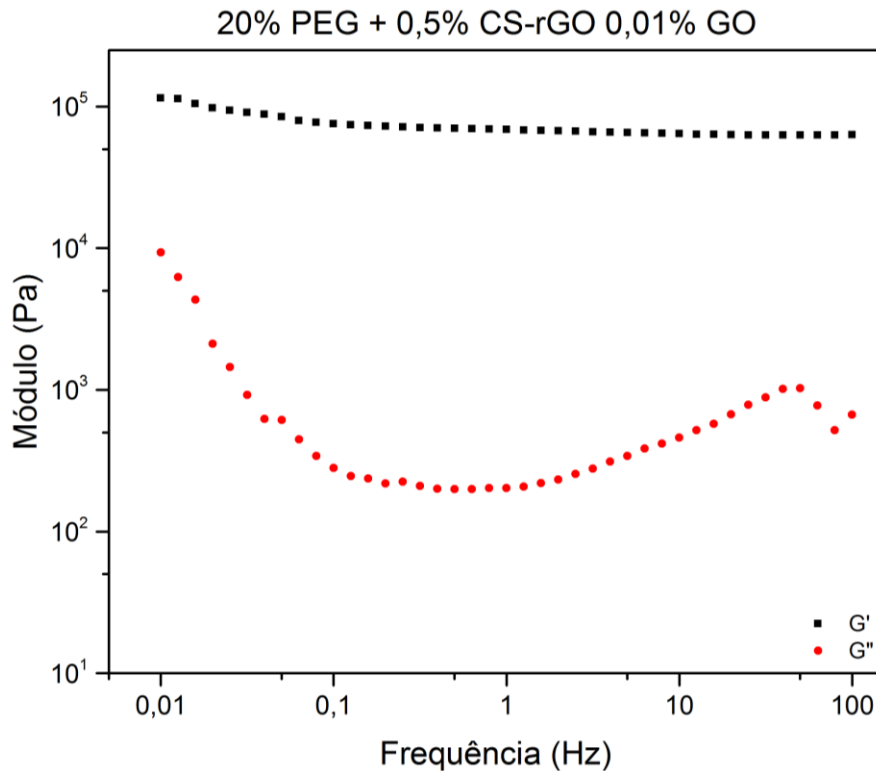


Figura 67. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 20 % PEG-MA + 0,5 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).

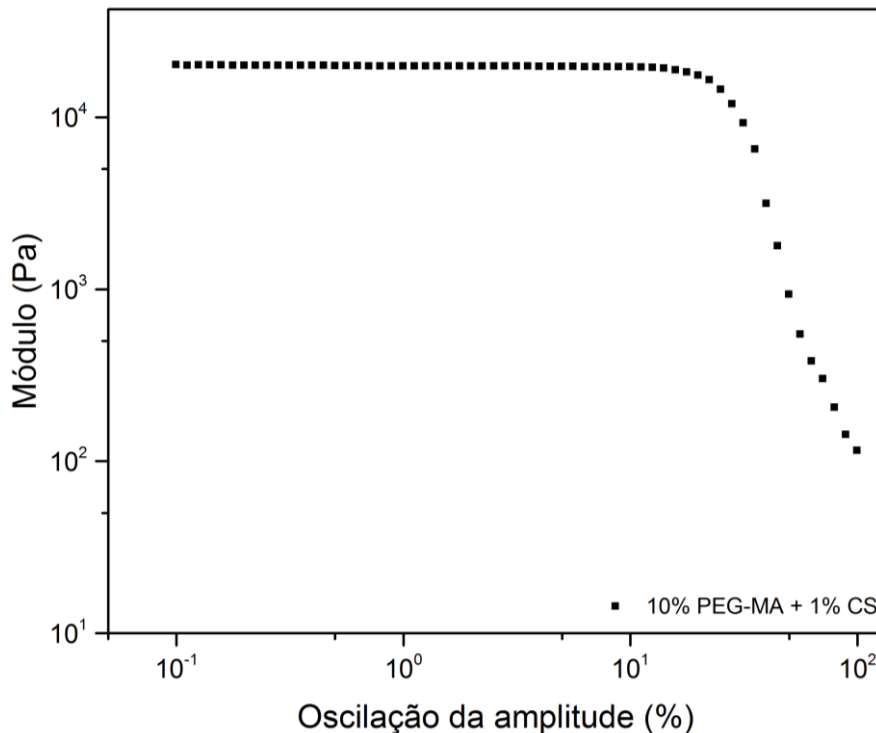


Figura 68. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 1 % CS, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.

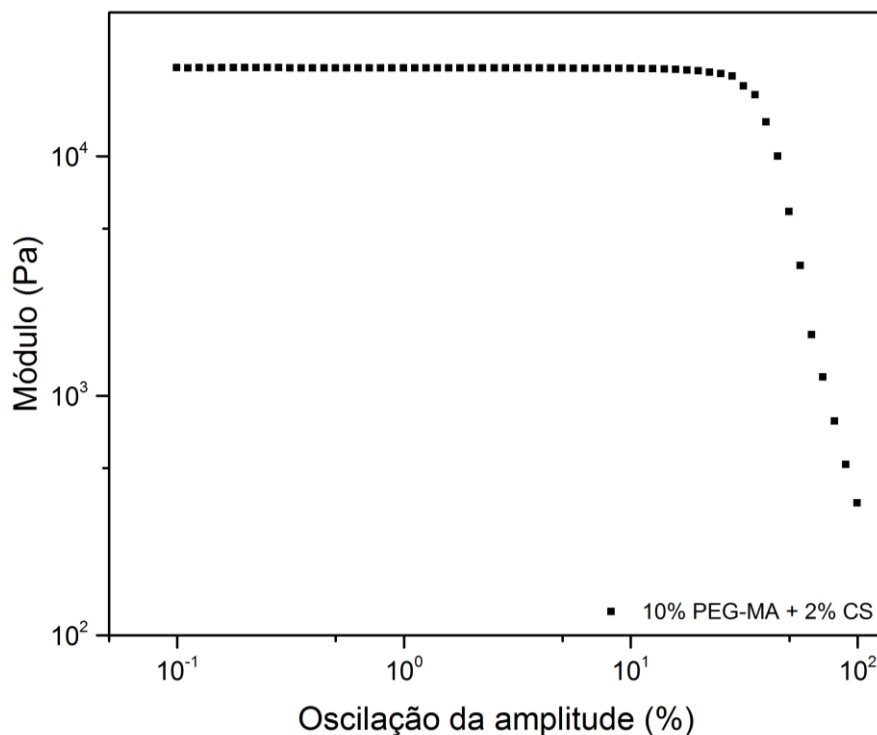


Figura 69. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 2 % CS, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.

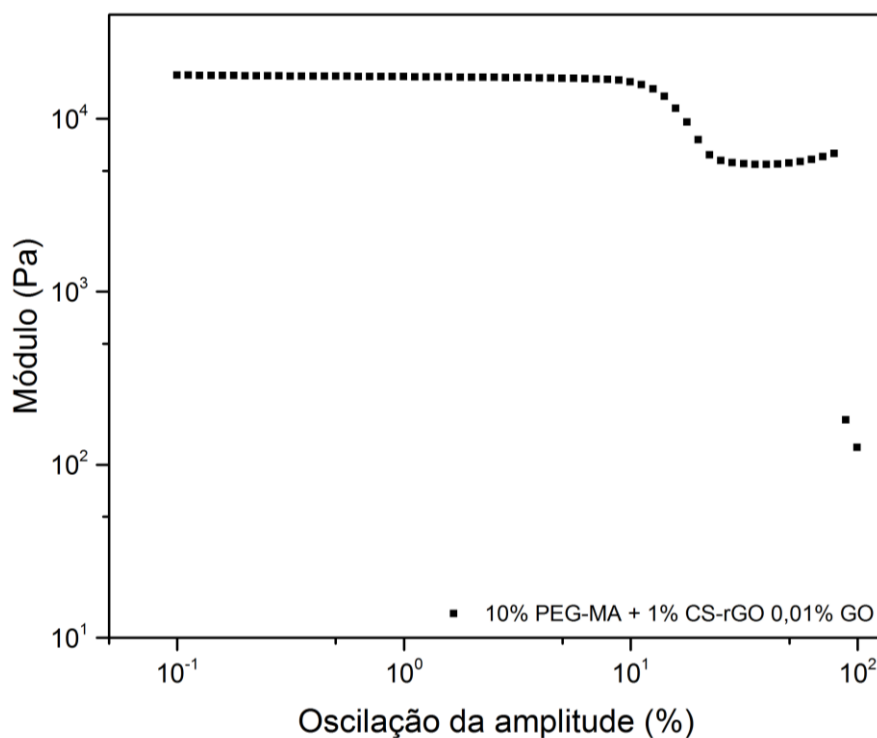


Figura 70. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 1 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.

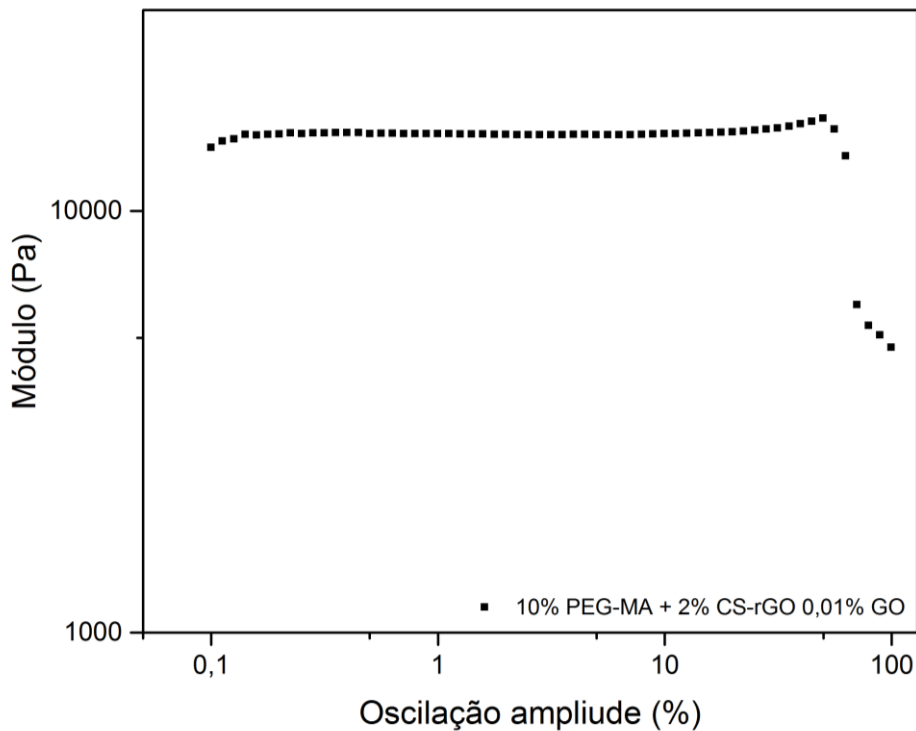


Figura 71. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da amplitude de deformação para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 2 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com frequência de 1 Hz e deformação de 0,1 – 100%.

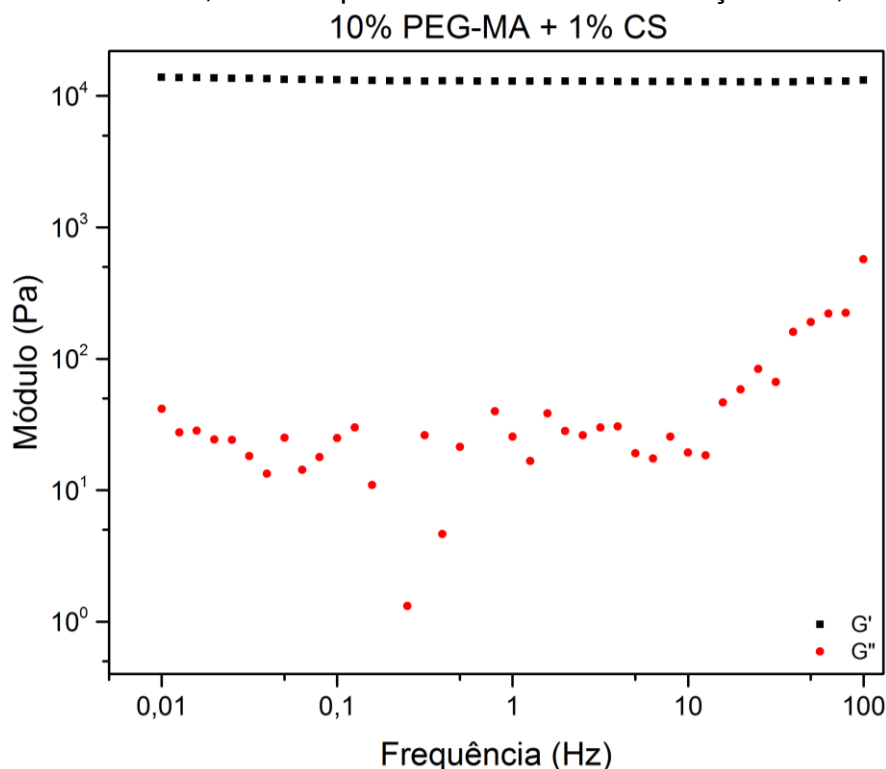


Figura 72. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 1 % CS, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).

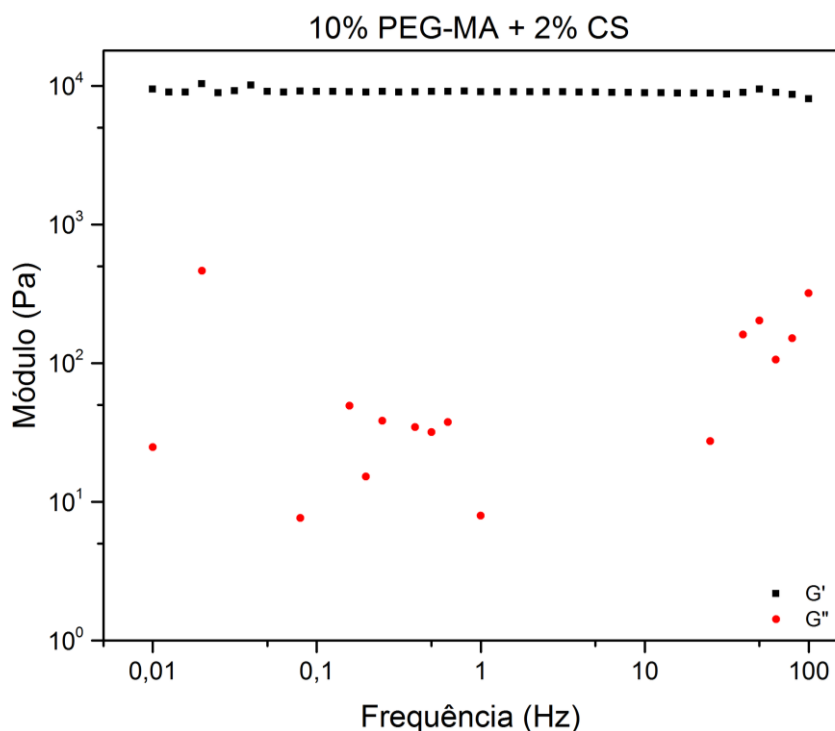


Figura 73. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 2 % CS, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).

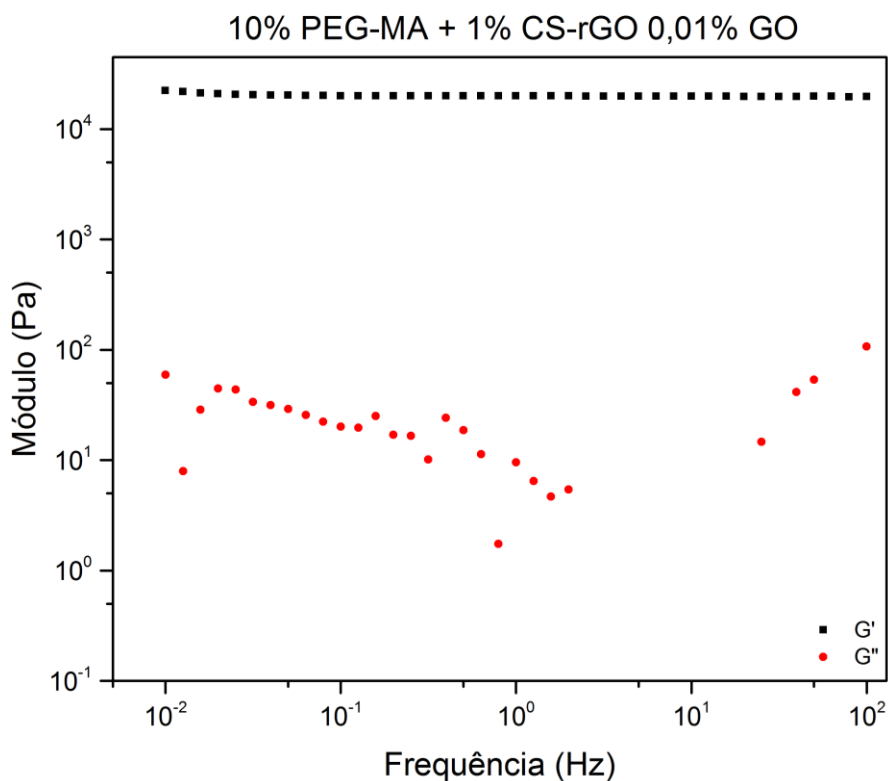


Figura 74. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 1 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37

°C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).

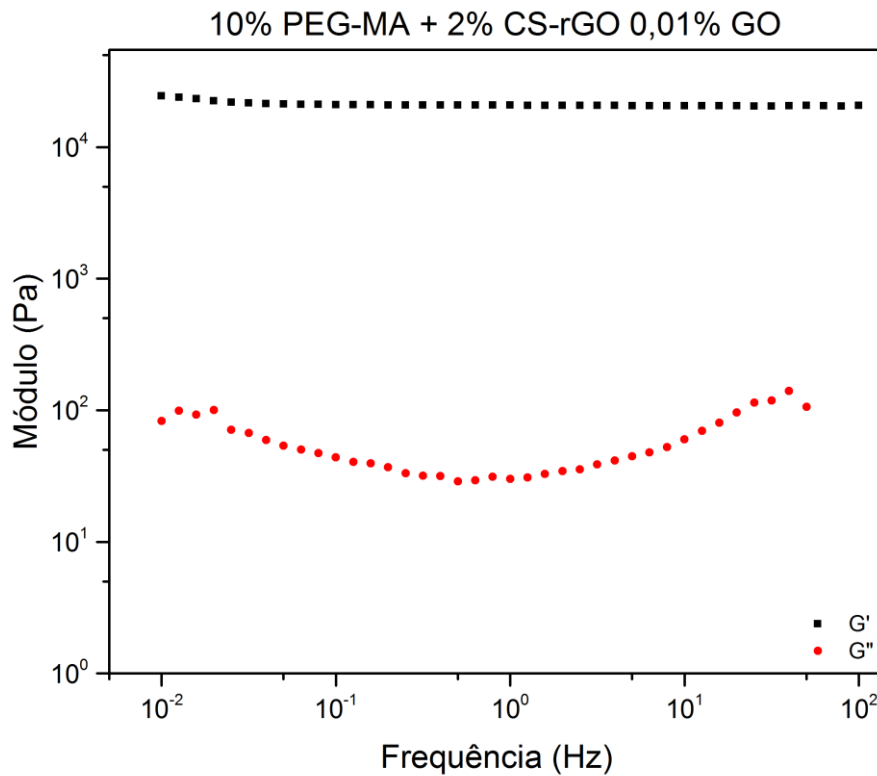


Figura 75. Gráficos de reologia obtidos através de análise de oscilação da frequência para os hidrogéis contendo 10 % PEG-MA + 2 % CS-rGO 0,01% GO, utilizando o sistema de iniciadores PPS e TEMED. Análise realizada a 37 °C, com 10% de deformação e frequência de 0,01 - 100 Hz. Módulo de armazenamento (G' – curva preta) e módulo de perda (G'' – curva vermelha).