

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
NÍVEL MESTRADO**

Kessi Marie de Moura Crescencio

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO *ULVAN* (*Ulva lactuca*
L.): UMA PLATAFORMA PARA PREPARAÇÃO DE SISTEMAS BIOMIMÉTICOS
PARTICULADOS**

**Sorocaba/SP
2020**

Kessi Marie de Moura Crescencio

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO *ULVAN* (*Ulva lactuca* L.): UMA PLATAFORMA PARA PREPARAÇÃO DE SISTEMAS BIOMIMÉTICOS PARTICULADOS

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud.

**Sorocaba/SP
2020**

Ficha Catalográfica

C939 Crescencio, Kessi Marie de Moura
Extração e caracterização físico-química do ulvan (*Ulva lactuca* L.) : uma plataforma para preparação de sistemas biomiméticos particulados / Kessi Marie de Moura Crescencio. – 2020.
113 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2020.

1. Algas marinhas. 2. Polissacarídeos. 3. Química farmacêutica.
4. Medicamentos – Formas farmacêuticas. 5. Farmacologia. I.
Chaud, Marco Vinícius, orient. II. Universidade de Sorocaba. III.
Título.

Kessi Marie de Moura Crescencio

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO *ULVAN* (*Ulva lactuca* L.): UMA PLATAFORMA PARA PREPARAÇÃO DE SISTEMAS BIOMIMÉTICOS PARTICULADOS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: 27/02/2020

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marco Vinicius Chaud
Universidade de Sorocaba - UNISO



Prof. Dr. José Martins de Oliveira Junior
Universidade de Sorocaba - UNISO



Profª. Drª. Thaís Francine Ribeiro Alves de Almeida
Universidade de Sorocaba - UNISO

**Sorocaba/SP
2020**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e em seguida aos meus pais, aos meus familiares, aos meus professores, aos meus amigos e a todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim, fazendo esta vida valer cada vez mais apenas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que sempre esteve ao meu lado e me deu forças nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Maria Célia e Moisés, que não mediram esforços para me ajudar a chegar até esta etapa da minha vida e que sempre me apoiaram. Obrigada pelos ensinamentos e por todo carinho que me proporcionaram.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud, por acreditar em meu potencial e por estar disposto a me orientar e a compartilhar comigo os seus conhecimentos.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia da Uniso (LaBNUS): Fernando Batain, Danieli Dona, Venâncio Amaral, Juliana Souza, Thaís Alves, Pâmela Medeiros, Cecília Torqueti, Victória Soeiro e Alessandra Rios. Obrigada por me acolherem e por me ajudarem quando as dificuldades surgiram. Agradeço a amizade, a troca de conhecimentos e por tornarem a rotina do laboratório mais leve e agradável. Agradeço em especial ao responsável técnico Fernando Batain pelo apoio e pela ajuda com as análises laboratoriais.

Aos meus amigos Ródnei Wesley Bolina Mello e Rafaeli de Fátima Seabra Pedrico que me apoiaram desde a graduação. Obrigada pela amizade e por todas as conversas que tivemos.

Ao Prof. Dr. José Martins de Oliveira Junior, ao responsável técnico Denicezar Ângelo Baldo e ao Laboratório de Física Nuclear aplicada da Universidade de Sorocaba (LaFINAU), pela contribuição ao realizar as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Fluorescência de Raios X (FRX) e Microtomografia Computadorizada.

Ao Prof. Dr. Paulo Antunes Horta Junior e ao Prof. Dr. Eduardo de Oliveira Bastos do Laboratório de Ficologia (LAFIC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) que cederam gentilmente a *Ulva lactuca Linnaeus* que foi utilizada neste trabalho para a extração do *ulvan*. Principalmente por não medirem esforços para nos ajudar e por acreditarem no projeto em parceria

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro por meio de concessão de taxa escolar PROSUC/CAPES (Número do Processo: 88887.178181/2018-00) no período de março de 2018 a novembro de 2018.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro por meio da concessão de bolsa de mestrado (Número do Processo: 2018/11350-6) no período de janeiro de 2019 a fevereiro de 2020.

Ao Prof. Dr. Edgard Robles Tardelli que me mostrou a possibilidade de fazer o mestrado em Ciências Farmacêuticas e me apresentou ao meu orientador Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud.

A Universidade de Sorocaba, pela oportunidade de obter o título de Engenheira Química e por possibilitar a realização do mestrado em Ciências Farmacêuticas.

A todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho acontecesse, direta ou indiretamente, e fizeram parte da minha formação, muito obrigada.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.”

(Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

INTRODUÇÃO: A *Ulva lactuca* apresenta vantagens que justificam sua exploração na pesquisa e no desenvolvimento de produtos da área farmacêutica, alimentícia e cosmética. O principal componente desta alga é o *ulvan*, uma classe de heteropolissacarídeos sulfatados. A estrutura química destes polissacarídeos se assemelha às estruturas moleculares do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina.

OBJETIVO: Avaliar a viabilidade da utilização da alga marinha *Ulva lactuca*, como fonte do *ulvan* para biomimetizar o efeito do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina.

MÉTODOS: O processo de extração do *ulvan* foi padronizado. O hidrogel de *ulvan* foi preparado em meio etanólico na presença de cloreto de cálcio. O rendimento em polissacarídeos foi determinado. O *ulvan* foi caracterizado por técnicas físicas e físico-químicas: avaliação macroscópica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX), microtomografia computadorizada, análise elementar, potencial hidrogeniônico (pH), calorimetria exploratória diferencial (CED), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF), fluorescência de raios X (FRX) e determinação do diâmetro da partícula (DP), potencial zeta (PZ) e índice de polidispersidade (IPD). O hidrogel de *ulvan* foi caracterizado por avaliação macroscópica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX) e propriedades físicas, físico-químicas e mecânicas do sistema coloidal.

RESULTADOS: O rendimento foi de 25,54%. A MEV mostrou material fibroso. Os resultados para pH, DP, PZ e IPD da dispersão aquosa de *ulvan* foram, respectivamente, $6,68 \pm 0,01$, $360,46 \pm 19,37$ nm, $(-) 11,21 \pm 2,26$ mV e $0,303 \pm 0,022$. A CED mostrou picos de fusão em $86,04$ °C e $94,86$ °C e pico de carbonização em $213,15$ °C. O espectro de IVTF confirmou os achados na literatura. FRX detectou a presença de enxofre, magnésio, potássio, cloro, cálcio, silício e fósforo. A DRX confirmou a estrutura semicristalina do *ulvan*. O pH, DP, PZ e IPD do hidrogel foram, respectivamente, $10,39 \pm 0,02$, $227,66 \pm 6,13$ nm, $(-) 25,21 \pm 0,98$ mV e $0,325 \pm 0,018$. A CED apresentou pico de fusão em $109,35$ °C. A MEV mostrou a estrutura cristalina do hidrogel. O resultado do IVTF mostrou modificações no espectro referente a reticulação com íons Ca^{2+} . O hidrogel obtido era termorresponsivo e apresentou resultados para dureza ($0,032 \pm 0,003$ N), compressibilidade ($0,29 \pm 0,05$ N.s⁻¹), adesividade ($0,29 \pm 0,05$ N.s⁻¹), coesividade ($0,16 \pm 0,01$ N) e mucoadesão ($0,305 \pm 0,067$ N). **CONCLUSÃO:** A análise dos resultados mostrou que a

metodologia utilizada foi eficiente para a realização da extração de *ulvan*, com alto grau de pureza, e para obtenção de um hidrogel de *ulvan*, a partir da reticulação do *ulvan* com íons cálcio (Ca^{2+}). Entretanto, este hidrogel, que foi desenvolvido com o intuito de avaliar a capacidade de utilizar o *ulvan* para biomimetizar o efeito do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina, não apresentou propriedades físicas, viscosimétricas e fisiomecânicas adequadas para a sua utilização como substituto destes polímeros. Desta forma, para que este material possa ser utilizado em aplicações biomédicas, como a aplicação em cartilagens articulares inflamadas e desgastadas, estas propriedades precisam ser aperfeiçoadas.

Palavras-chave: *Ulva lactuca*. *Ulvan*. Hidrogel. Ácido hialurônico. Sulfato de condroitina.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Ulva lactuca* has advantages that justify its exploration in the research and development of pharmaceutical, food and cosmetic products. The main component of this alga is ulvan, a class of sulfated heteropolysaccharides. The chemical structure of these polysaccharides is similar to the molecular structures of hyaluronic acid and chondroitin sulfate. **OBJECTIVE:** To evaluate the viability of using the marine alga *Ulva lactuca*, as the source of ulvan to biomimeticize the effect of hyaluronic acid and chondroitin sulfate. **METHODS:** The ulvan extraction process was standardized. The ulvan hydrogel was prepared in an ethanolic medium in the presence of calcium chloride. The calculation of the polysaccharide yield was determined. Ulvan was characterized by physical and physical-chemical techniques: macroscopic evaluation, scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), computerized microtomography, elemental analysis, pH, differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray fluorescence (XRF), determination of particle diameter (PD), zeta potential (ZP) and polydispersity index (PDI). The ulvan hydrogel was characterized by macroscopic evaluation, scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD) and physical, physicochemical and mechanical properties of the colloidal system. **RESULTS:** The yield was 25.54%. SEM showed fibrous material. The results for pH, DP, ZP and PDI of the aqueous dispersion of ulvan were, respectively, 6.68 ± 0.01 , 360.46 ± 19.37 nm, $(-) 11.21 \pm 2.26$ mV e 0.303 ± 0.022 . The DSC showed melting peaks at 86.04 °C and 94.86 °C, and carbonization peak at 213.15 °C. The FTIR spectrum confirmed the findings in the literature. XRF detected the presence of sulfur, magnesium, potassium, chlorine, calcium, silicon and phosphorus. XRD confirmed the semicrystalline structure of ulvan. The pH, DP, ZP and PDI of the hydrogel were, respectively, 10.39 ± 0.02 , 227.66 ± 6.13 nm, $(-) 25.21 \pm 0.98$ mV e 0.325 ± 0.018 . DSC showed a melting peak of 109.35 °C. SEM showed the crystalline structure of the hydrogel. The FTIR result showed changes in the spectrum related to crosslinking with Ca^{2+} ions. The hydrogel obtained was thermoresponsive and showed results for hardness (0.032 ± 0.003 N), compressibility (0.29 ± 0.05 N. s^{-1}), adhesiveness (0.29 ± 0.05 N. s^{-1}), cohesiveness (0.16 ± 0.01 N) and mucoadhesion (0.305 ± 0.067 N). **CONCLUSION:** The analysis of the results showed that the methodology used was efficient for the extraction of ulvan, with a high degree of purity, and for obtaining an ulvan hydrogel, from the crosslinking

of the ulvan with calcium ions (Ca^{2+}). However, this hydrogel that was developed in order to assess the ability to use ulvan to biomimetize the effect of hyaluronic acid and chondroitin sulfate, did not have adequate physical, viscosimetric and physio-mechanical properties for its use as a substitute for these polymers. Thus, so that this material can be used in biomedical applications, such as the application in inflamed and worn articular cartilages, these properties need to be improved.

Keywords: *Ulva lactuca*. Ulvan. Hydrogel. Hyaluronic acid. Chondroitin sulfate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alga <i>Ulva lactuca</i> L. (a) e maré verde formada em águas eutróficas (b) ..	24
Figura 2 – Estrutura química do <i>ulvan</i>	24
Figura 3 – Estruturas químicas do <i>ulvan</i> , do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina e suas respectivas semelhanças e diferenças.....	26
Figura 4 - Estrutura química do ácido hialurônico	37
Figura 5 - Estrutura química do sulfato de condroitina	40
Figura 6 - Diagrama esquemático das etapas envolvidas na caracterização da matéria-prima, extração e caracterização do <i>ulvan</i> da <i>Ulva lactuca</i> e do resíduo obtido na filtração.....	43
Figura 7 - Diagrama esquemático das etapas envolvidas na caracterização do hidrogel de <i>ulvan</i> , do cloreto de cálcio di-hidratado e do sobrenadante contendo solução de cloreto de cálcio 40%	44
Figura 8 – Delineamento experimental do processo de extração do <i>ulvan</i>	49
Figura 9 - Imagens fotográficas das amostras de <i>Ulva lactuca</i> seca e triturada (1); resíduo do processo de filtração antes da trituração (2); <i>ulvan</i> liofilizado em tubo Falcon (3) e amostra previamente preparada para a caracterização físico-química (4)	59
Figura 10 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do <i>ulvan</i>	61
Figura 11 - Resultados dos ensaios de calorimetria exploratória diferencial para a <i>Ulva lactuca</i> seca e triturada, resíduo da filtração e <i>ulvan</i>	63
Figura 12 - Resultados dos ensaios de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier para a <i>Ulva lactuca</i> seca e triturada, resíduo da filtração e <i>ulvan</i>	66
Figura 13 – Características morfométricas da pastilha de <i>ulvan</i> avaliadas por microtomografia computadorizada	75
Figura 14 – Características morfométricas da pastilha de <i>Ulva lactuca</i> avaliadas por microtomografia computadorizada	75
Figura 15 – Difrátogramas de raios X do <i>ulvan</i> e da <i>Ulva lactuca</i>	77
Figura 16 - Imagens fotográficas do hidrogel de <i>ulvan</i> após o término do processo de gelificação (a-c) e do hidrogel de <i>ulvan</i> após liofilização (d)	78
Figura 17 - Imagens fotográficas do hidrogel de <i>ulvan</i> mantido a temperatura ambiente (1) e mantido em geladeira (2) antes e depois da inversão completa dos tubos	79

Figura 18 - Imagens fotográficas do hidrogel de <i>ulvan</i> após inclinação parcial do tubo e após inversão total do tubo	80
Figura 19 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura do hidrogel de <i>ulvan</i> liofilizado.....	82
Figura 20 - Resultados dos ensaios de calorimetria exploratória diferencial para o hidrogel de <i>ulvan</i> , o sobrenadante com solução de cloreto de cálcio 40% e o cloreto de cálcio di-hidratado em comparação com o <i>ulvan</i>	85
Figura 21 - Resultados dos ensaios de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier para o hidrogel de <i>ulvan</i> , o sobrenadante com solução de cloreto de cálcio 40% e o cloreto de cálcio di-hidratado em comparação com o <i>ulvan</i>	87
Figura 22 – Esquema do processo de reticulação do <i>ulvan</i> com íons cálcio para a obtenção do hidrogel de <i>ulvan</i>	88
Figura 23 - Difrátogramas de raios X do hidrogel de <i>ulvan</i> e do <i>ulvan</i>	91
Figura 24 - Estudo da viscosidade do hidrogel de <i>ulvan</i> em função da variação da temperatura.....	96
Figura 25 - Resultados obtidos para as propriedades mecânicas (A) compressibilidade, (B) adesividade, (C) dureza e (D) coesividade do hidrogel de <i>ulvan</i>	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo dos diferentes métodos de extração do <i>ulvan</i>	33
Tabela 2 – Definição e rendimento dos sistemas delineados previamente para a determinação do melhor processo de extração do <i>ulvan</i>	47
Tabela 3 - Resultados da análise elementar do <i>ulvan</i> e da <i>Ulva lactuca</i>	67
Tabela 4 – Resultados de FRX para a alga <i>Ulva lactuca</i> L. e para o <i>ulvan</i>	70
Tabela 5 – Características morfológicas e grau de anisotropia das pastilhas de <i>ulvan</i> e de <i>Ulva lactuca</i>	74
Tabela 6– Resultados para os ensaios das propriedades mecânicas: dureza, compressibilidade, adesividade e coesividade do hidrogel de <i>ulvan</i> (média ± Desvio Padrão) (n=3)	99

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μ CT	Microtomografia computadorizada
Ag	Prata
Al	Alumínio
Br	Bromo
C	Carbono
$C_6H_{10}O_6$	Celulose
Ca	Cálcio
Ca^{2+}	Íons cálcio
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Cloreto de cálcio di-hidratado
$CaCO_3$	Carbonato de cálcio
CED	Calorimetria Exploratória Diferencial
Cl	Cloro
CO_2	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
$CuSO_4$	Sulfato de cobre
DP	Diâmetro de partícula
DRX	Difração de raios X
EDL	Espalhamento dinâmico de luz
ELAF	Espalhamento de luz por análise de fase
Fe	Ferro
FRX	Fluorescência de Raios X
GAG	Glicosaminoglicana
H	Hidrogênio
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IPD	Índice de polidispersidade
IVTF	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
K	Potássio
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg	Magnésio
MM	Massa molar
Mn	Manganês

N	Nitrogênio
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
P	Fósforo
pH	Potencial hidrogeniônico
PZ	Potencial zeta
Rb	Rubídio
RTA	Reflectância Total Atenuada
S	Enxofre
SC	Sulfato de condroitina
Si	Silício
Sr	Estrôncio
Tg	Transição vítrea
Tgel-sol	Transição de gel para solução
Ti	Titânio
Tsol-gel	Transição de solução para gel

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDAS

%	Porcentagem
μ	Micra
μA	Microampère
μm	Micrômetro
Å	Ångström
atm	Atmosfera
cm ⁻¹	Inverso de centímetro
cP	CentiPoise
Da	Dalton
g	Grama
<i>g</i>	Unidades de gravidade (centrifugação)
h	Hora
kDa	Quilodalton
keV	Quilo elétrons-volt
kV	Quilovolt

L	Litro
M	Molar (mol/L)
m/m	Massa/massa
mA	Miliampère
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mL.min ⁻¹	Mililitro por minuto
mL/g	Mililitro por grama
mm	Milímetro
mm.s ⁻¹	Milímetro por segundo
mmHg	Milímetro de mercúrio
mV	Milivolt
N	Newton
N.s ⁻¹	Newton por segundo
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
°C.min ⁻¹	Grau Celsius por minuto
pA	Picoampère
ppm	Partes por milhão
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
U/g	Unidade por grama
v/v	Volume/volume
W	Watt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Algas marinhas	22
2.2	Alga <i>Ulva lactuca</i> Linnaeus.....	23
2.3	<i>Ulvan</i>	24
2.4	Técnicas de extração do <i>ulvan</i>	27
2.5	Materiais biomiméticos	34
2.6	Aplicações biomédicas do <i>ulvan</i> e vantagens de sua utilização	35
2.7	Hidrogel de <i>ulvan</i>.....	36
2.8	Ácido hialurônico.....	37
2.9	Sulfato de condroitina	40
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo geral.....	42
3.2	Objetivos específicos	42
4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	43
5	MATERIAL E MÉTODOS	45
5.1	Material	45
5.2	Métodos	45
5.2.1	Determinação do teor de umidade residual e da massa seca da <i>Ulva lactuca</i> Linnaeus.....	45
5.2.2	Extração e caracterização física e físico-química do <i>ulvan</i>	45
5.2.2.1	Extração do <i>ulvan</i>	45
5.2.2.2	Avaliação macroscópica do <i>ulvan</i> , da <i>Ulva lactuca</i> seca e triturada e do resíduo obtido na filtração	49
5.2.2.3	Rendimento em polissacarídeos	49
5.2.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	49
5.2.2.5	Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)	50
5.2.2.6	Calorimetria Exploratória Diferencial (CED).....	50
5.2.2.7	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF).....	50
5.2.2.8	Análise Elementar	51
5.2.2.9	Fluorescência de raios X (FRX)	51
5.2.2.10	Determinação do diâmetro de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidade.....	52

5.2.2.11	Microtomografia computadorizada (μ CT).....	52
5.2.2.12	Difração de raios X (DRX).....	53
5.2.3	Obtenção e caracterização física e físico-química do hidrogel de <i>ulvan</i>	53
5.2.3.1	Gelificação do <i>ulvan</i>	53
5.2.3.2	Avaliação macroscópica do hidrogel de <i>ulvan</i>	54
5.2.3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	55
5.2.3.4	Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)	55
5.2.3.5	Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)	55
5.2.3.6	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF).....	56
5.2.3.7	Difração de raios X (DRX).....	56
5.2.3.8	Determinação do diâmetro de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidade.....	56
5.2.3.9	Viscosidade do hidrogel de <i>ulvan</i> nas temperaturas Tgel-sol e Tsol-gel.....	57
5.2.3.10	Propriedades mecânicas.....	57
5.2.3.11	Propriedade mucoadesiva.....	58
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
6.1	Extração e caracterização física e físico-química do <i>ulvan</i>	59
6.1.1	Avaliação macroscópica do <i>ulvan</i> , da <i>Ulva lactuca</i> seca e triturada e do resíduo obtido na filtração	59
6.1.2	Rendimento em polissacarídeos.....	60
6.1.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	60
6.1.4	Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)	62
6.1.5	Calorimetria Exploratória Diferencial (CED).....	62
6.1.6	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF)	65
6.1.7	Análise elementar	67
6.1.8	Fluorescência de raios X (FRX).....	69
6.1.9	Determinação do diâmetro de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidade	73
6.1.10	Microtomografia computadorizada.....	74
6.1.11	Difração de raios X (DRX)	76
6.2	Obtenção e caracterização física e físico-química do hidrogel de <i>ulvan</i> ..	77
6.2.1	Avaliação macroscópica do hidrogel de <i>ulvan</i>	77
6.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	81
6.2.3	Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)	83
6.2.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (CED).....	84
6.2.5	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF)	86

6.2.6	Difração de raios X (DRX)	90
6.2.7	Determinação do diâmetro de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidade	94
6.2.8	Viscosidade do hidrogel de <i>ulvan</i> nas temperaturas Tgel-sol e Tsol-gel	95
6.2.9	Propriedades mecânicas	98
6.2.10	Propriedade mucoadesiva	101
7	CONCLUSÃO.....	103
8	REFERÊNCIAS	105

1 INTRODUÇÃO

A *Ulva lactuca* Linnaeus é uma alga marinha verde conhecida por sua capacidade de se proliferar rapidamente em águas eutróficas, proporcionando a formação de “marés verdes” responsáveis pela morte de organismos aquáticos devido à hipóxia. Em decorrência dos problemas ambientais causados por esta alga, diversos estudos estão sendo desenvolvidos com o intuito de proporcionar o aumento da sua exploração comercial, principalmente em relação ao seu principal constituinte o *ulvan*.

O *ulvan* é uma classe de polissacarídeos sulfatados presente na parede celular da *Ulva lactuca*. Estes polissacarídeos apresentam estrutura química semelhante a estrutura das glicosaminoglicanas, ácido hialurônico e sulfato de condroitina, que são utilizadas para a manutenção da homeostase e da integridade biomecânica de tecidos e fluidos que exercem funções fisiológicas, estruturais e lubrificantes.

Desta forma, sua semelhança com estas glicosaminoglicanas e a possibilidade de obter este material, a partir de recursos renováveis de baixo custo, fazem com que a investigação mais aprofundada sobre a atividade biológica e a viabilidade de utilizar o *ulvan* para aplicações biomédicas, seja aprovada no mérito e apoiada com incentivos financeiros institucionais, governamentais ou privados.

Neste trabalho, foi projetado explorar a hipótese de que é possível obter sistemas polissacarídicos gelificados microestruturados ou nanoestruturados, similares ao ácido hialurônico e ao sulfato de condroitina, a partir da gelificação do *ulvan* extraído da alga marinha *Ulva lactuca*. A outra hipótese explorada é de que a estrutura polimérica do *ulvan* pode originar estes sistemas polissacarídicos gelificados a partir da reticulação com íons cálcio (Ca^{2+}). A alga foi fornecida pelo Laboratório de Ficologia (LAFIC), da Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis.

No presente estudo, foi realizada a extração, a avaliação e a caracterização do *ulvan* (polissacarídeos sulfatados) da alga *Ulva lactuca*, assim como a caracterização da alga *in natura* e do resíduo proveniente da etapa de filtração, presente no processo extrativo executado.

Após estes processos ocorreu a obtenção e caracterização do hidrogel de *ulvan*, que assim como o polissacarídeo sulfatado extraído foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura, calorimetria exploratória diferencial, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, medição de potencial

hidrogeniônico, determinação do diâmetro de partícula, índice de polidispersidade e potencial zeta, avaliação macroscópica e difração de raios X.

Além disto, o *ulvan* foi caracterizado pela determinação do rendimento em polissacarídeos, fluorescência de raios X, microtomografia computadorizada e análise elementar e o hidrogel de *ulvan* foi caracterizado pela determinação da viscosidade na temperatura de transição sol-gel e na temperatura de transição gel-sol, propriedades mecânicas (dureza, compressibilidade, adesividade e coesividade) e propriedade mucoadesiva.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Algas marinhas

Nos últimos anos, organismos marinhos distintos começaram a ser considerados como fontes de materiais com alto valor agregado. Entretanto, entre as algas pertencentes aos três principais filos (divisões) de algas marinhas: *Chlorophyta* (algas verdes), *Phaeophyta* (algas marrons) e *Rhodophyta* (algas vermelhas), as algas marinhas verdes são aquelas que possuem um índice elevado de exploração (THANH *et al.*, 2016).

Ulva (*Chlorophyta*) são algas marinhas verdes e estão distribuídas na costa de todos os oceanos terrestres e em reservatórios de água doce. Contudo, não há estudos fitoquímicos comparando as algas de ambas as origens. O principal gênero desta ordem de algas verdes, o gênero *Ulva*, é conhecido por estar envolvido em processos prejudiciais ao meio aquático (JOHN; RINDI, 2015; STEINHAGEN *et al.*, 2019).

De fato, esta biomassa de algas prolifera muito rapidamente em águas eutróficas (águas com alta concentração de nutrientes) de regiões costeiras e de reservatórios sob a forma de "marés verdes" levando à morte de organismos aquáticos por hipóxia. As preocupações ambientais também ocorrem para a eliminação desta enorme biomassa, que é depositada na costa ou nas margens dos reservatórios, criando problemas para a população local (SARKAR, 2018; TSUBAKI *et al.*, 2016; TZIVELEKA *et al.*, 2018).

De acordo com Abirami e Kowsalya (2011), além de possuir potencial nutritivo, as algas apresentam potenciais nutraceuticos, ou seja, possuem nutrientes que proporcionam benefícios à saúde. Desta forma, estes organismos marinhos apresentam atividade antioxidante, anticoagulante, antibacteriana, anticancerígena e antimutagênica (ABIRAMI; KOWSALYA, 2011).

No futuro, é esperado que as algas se tornem um dos principais recursos marinhos com elevado valor nutritivo e diversos potenciais nutraceuticos. Um exemplo disto, é a alga *Ulva lactuca* que devido à sua estrutura única e à sua composição bioquímica, pode ter as suas propriedades estudadas para ser utilizada na indústria alimentícia, na medicina, na produção de energia e como ferramenta biotecnológica (ABIRAMI; KOWSALYA, 2011).

2.2 Alga *Ulva lactuca* Linnaeus

A alga *Ulva lactuca* L. (Figura 1a) é uma espécie de alga verde que apresenta distribuição mundial e elevada proliferação em águas com eutrofização (GONZÁLEZ-BALLESTEROS *et al.*, 2019). De acordo com Tian *et al.* (2015), a *Ulva lactuca* L. é uma espécie comum de algas verdes, pertencente ao filo *Chlorophyta*. Esta alga é encontrada na América do Sul, na América do Norte, nas Ilhas do Caribe, na Europa, na África, nas ilhas localizadas no Oceano Índico, no Sudoeste da Ásia, na China, nas Ilhas do Pacífico, na Nova Zelândia e na Austrália (TIAN *et al.*, 2015).

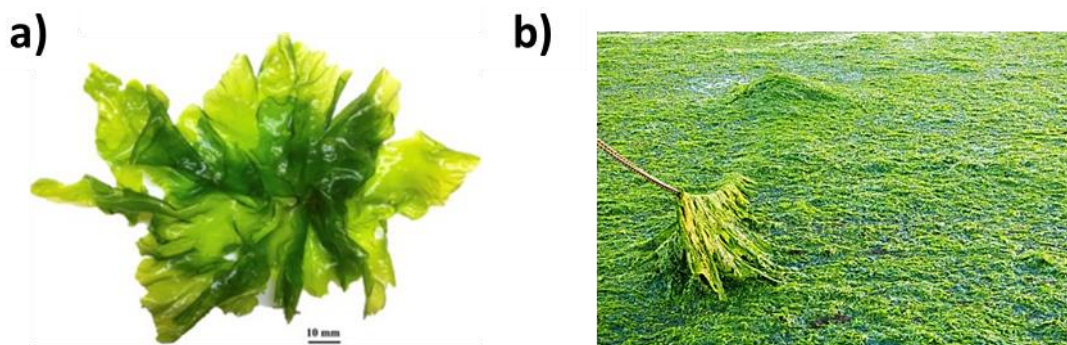
De acordo com Thanh *et al.* (2016), a *Ulva lactuca*, também conhecida como “alface do mar”, é uma alga comestível que pertence ao filo das algas verdes. Diversos estudos sobre o *ulvan* extraído desta espécie de alga têm sido realizados, por causa do interesse na estrutura e na atividade biológica deste polissacarídeo sulfatado (THANH *et al.*, 2016). Recentemente, os estudos se voltaram principalmente para a utilização desta alga na engenharia de tecidos e na administração de medicamentos. No entanto, outros usos foram descritos na literatura como a síntese de nanopartículas a partir do extrato da *Ulva lactuca* (GONZÁLEZ-BALLESTEROS *et al.*, 2019).

Uma elevada quantidade desta alga é retirada das praias todos os anos, sendo que a decomposição da mesma produz metano, sulfureto de hidrogênio e outros gases que são prejudiciais ao meio ambiente. Em decorrência de ser encontrada em abundância e causar problemas ambientais, esta alga se tornou alvo de estudos nos últimos anos com o intuito de promover a otimização de suas aplicações nas indústrias produtoras de medicamentos, cosméticos e alimentos (GONZÁLEZ-BALLESTEROS *et al.*, 2019).

O elevado percentual de biomassa presente na composição da *Ulva lactuca*, constituinte das marés verdes (Figura 1b), faz com que esta alga seja considerada como uma matéria-prima que pode ser utilizada em biorrefinarias. Desta forma, entre as aplicações industriais da *Ulva lactuca* se encontram a sua utilização na produção de suplementos alimentares, ração para animais, biofertilizantes e biocombustíveis. Esta alga é constituída principalmente de proteínas (16 a 30%) e carboidratos (60 a 65%), além de apresentar lipídeos (4 a 5%) em sua composição. Os carboidratos consistem em polissacarídeos sulfatados, celulose e hemicelulose (MHATRE *et al.*, 2019).

Recentemente, os estudos sobre as aplicações da *Ulva lactuca*, mostraram que diversos extratos desta alga apresentam atividades relacionadas com a biologia e a farmacologia como atividades anticoagulantes, antivirais, antioxidantes, anti-inflamatórias e antinefróticas. Além disto, existem poucos registros sobre a atividade antitumoral desta alga na literatura (HUSSEIN *et al.*, 2015).

Figura 1 - Alga *Ulva lactuca* L. (a) e maré verde formada em águas eutróficas (b)

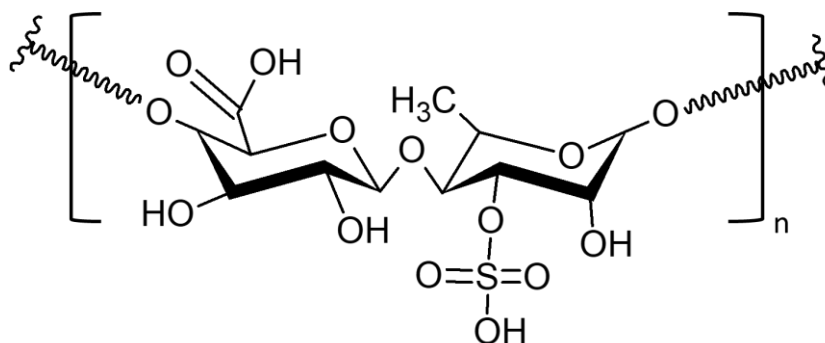


Fonte: (a) Farias *et al.* 2017 e (b) DEPOSITPHOTOS. Disponível em: <https://br.depositphotos.com/stock-photos/ulva-lactuca.html>.

2.3 *Ulván*

O *ulvan* (Figura 2) é uma classe de polissacarídeos sulfatados aniônicos e solúveis em água, proveniente da parede celular da alga *Ulva lactuca*, que pode ser utilizado nas indústrias de alimentos, de medicamentos e de produtos químicos (MHATRE *et al.*, 2019; TZIVELEKA *et al.*, 2018).

Figura 2 – Estrutura química do *ulvan*



Fonte: Elaboração própria.

Ao longo dos anos, as características físicas e a aplicação farmacológica do *ulvan* foram investigadas e as suas diversas aplicações biológicas foram descritas,

dentre elas a capacidade de atuar como antiviral e antibacteriano, evitar a coagulação e a oxidação e evitar que o sangue apresente uma concentração elevada de lipídeos (TZIVELEKA *et al.*, 2018). Além disto, existem relatos de que este polissacarídeo apresenta diversas atividades fisiológicas, entre elas a capacidade de atuar como anticancerígeno e antitumoral (TRAN *et al.*, 2018).

Os polissacarídeos do *ulvan*, devido ao seu conteúdo em ácido glucurônico e grupos sulfato, possuem propriedades estruturais únicas, uma vez que a unidade de repetição compartilha afinidades químicas com glicosaminoglicanas, como ácido hialurônico e sulfato de condroitina (Figura 3) (CUNHA; GRENHA, 2016). Apesar de apresentar grupamentos químicos em comum com estas duas glicosaminoglicanas, o *ulvan* não apresenta o grupamento amida que é encontrado no ácido hialurônico e no sulfato de condroitina.

De acordo com Tian *et al.* (2015), os polissacarídeos são os principais produtos químicos presentes na estrutura da alga *Ulva lactuca* L. Os produtos químicos naturais de recursos biológicos marinhos são amplamente investigados e utilizados devido às suas boas atividades biológicas. Como resultado destas atividades, eles podem ser utilizados em uma ampla variedade de setores industriais, como os setores de alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, nutrição e biomateriais (TIAN *et al.*, 2015).

O primeiro estudo sobre *ulvan* foi executado na alga *Ulva lactuca* por Brading, George-Plant e Hardy no ano de 1954. Estes autores sugeriram a estrutura química dos polissacarídeos sulfatados e supuseram que estes apresentavam ligação com a glicose ou com a ramnose. Em seguida, ocorreu a confirmação de que os polissacarídeos da *Ulva lactuca* poderiam apresentar ácidos urônicos, arabinose, xilose e ácido glucurônico como componentes (PANKIEWICZ *et al.*, 2016).

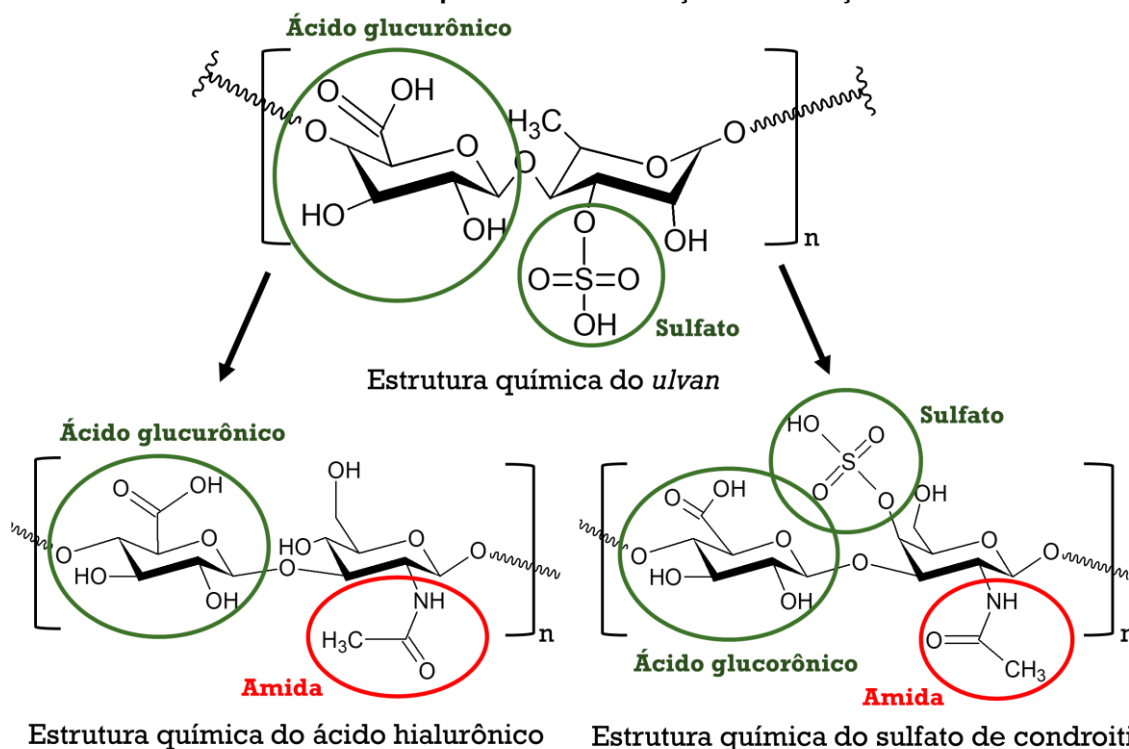
A denominação “*ulvan*” foi sugerida por Lahaye e Axelos no ano de 1993, pela primeira vez. A partir de estudos subsequentes com a *Ulva rígida*, o ácido glucurônico e a ramnose sulfatada foram definidos como principais componentes do *ulvan* e em seguida, o ácido idurônico também foi definido como um dos constituintes deste polissacarídeo (PANKIEWICZ *et al.*, 2016).

A ramnose, a xilose e os ácidos glucurônico e idurônico são os principais carboidratos constituintes do *ulvan*, que apresenta uma composição complexa e variável destes açúcares e contém grupos sulfato em sua estrutura (TZIVELEKA *et al.*, 2018; TRAN *et al.*, 2018).

A variação desta composição é influenciada pelos seguintes fatores: espécie de alga verde utilizada, região de cultivo e processo de extração empregado. Além de interferir na composição química deste polímero, as características do processo de extração das algas são responsáveis por influenciar o rendimento, o peso molecular, a textura e o comportamento reológico do *ulvan* proveniente da *Ulva lactuca* (TRAN *et al.*, 2018).

Uma particularidade que distingue o *ulvan* de outras fontes polissacarídicas (*fucoïdan* e carragenina) é a grande quantidade dos heteropolissacarídeos sulfatados e do grupo funcional glicosaminoglicana, cujo benefício biológico tem despertado grande interesse, uma vez que a presença e a distribuição de grupos sulfatos nestes polissacarídeos são reportados por terem papel importante como antiviral, anticoagulante e antioxidante (CHIELLINI; MORELLI, 2011; CUNHA; GRENHA, 2016).

Figura 3 – Estruturas químicas do *ulvan*, do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina e suas respectivas semelhanças e diferenças



Nota: As estruturas circuladas com a cor verde são as estruturas que o *ulvan* apresenta em comum com o ácido hialurônico e com o sulfato de condroitina. As estruturas circuladas com a cor vermelha indicam o grupo amida que está presente no ácido hialurônico e no sulfato de condroitina, entretanto está ausente no *ulvan*.

Fonte: Elaboração própria.

2.4 Técnicas de extração do *ulvan*

De acordo com Alves *et al.* (2010), para a realização da extração do *ulvan*, a alga *Ulva sp.* foi submetida ao processo de extração Soxhlet, com a utilização dos solventes diclorometano e acetona, para a remoção da maior parte dos lipídeos e pigmentos. Em seguida, a alga foi submetida à extração aquosa na faixa de temperatura de 75-85 °C e a dispersão resultante foi filtrada. O extrato aquoso obtido foi centrifugado, concentrado em evaporador rotativo e submetido ao processo de desproteinização com proteinase K (ALVES *et al.*, 2010).

Após estes processos, este extrato foi submetido aos processos de descoloração e desodorização a partir do método de adsorção em carvão ativado. Em seguida, o extrato aquoso foi submetido aos processos de centrifugação, filtração e precipitação com 4 volumes de etanol absoluto, sendo que o precipitado recuperado foi submetido à liofilização. O rendimento do polissacarídeo *ulvan* neste processo estava na faixa de 10-20 % (ALVES *et al.*, 2010).

No método de extração Soxhlet, a amostra é acondicionada em um cartucho de papel de filtro e disposta no extrator Soxhlet e, em seguida, um volume de 300 mL dos solventes é adicionado em um balão de fundo redondo. Antes do início do processo, o balão é ligado à extremidade inferior do extrator Soxhlet e um condensador é ligado à sua extremidade superior. A amostra permanece durante 16 h sob refluxo com temperatura controlada para que não ocorra a ebulição dos solventes (BEZERRA-SILVA *et al.*, 2010; SANTOS, 2011).

O término da extração dos pigmentos e dos lipídeos é determinado em decorrência da coloração dos solventes, uma vez que quando eles não apresentam alteração de sua coloração ao passar pela amostra, esta não apresenta mais pigmentos (BEZERRA-SILVA *et al.*, 2010; SANTOS, 2011).

Alves, Sousa e Reis (2013a) e Barros *et al.* (2013), se basearam no método descrito por Alves *et al.* (2010) para realizar a extração do *ulvan*, entretanto, substituíram a alga *Ulva sp.* pela alga *Ulva lactuca* e realizaram a remoção do amido presente nesta alga antes de extrair este polissacarídeo sulfatado. O rendimento obtido por Alves, Souza e Reis (2013a) estava na faixa de 10-20%, entretanto Barros *et al.* (2012) não informaram o rendimento obtido (ALVES; SOUSA; REIS, 2013a; BARROS *et al.*, 2013).

Costa *et al.* (2012), também se basearam no método descrito por Alves *et al.* (2010) para realizar a extração do *ulvan* presente na alga *Ulva lactuca*, no entanto, realizaram algumas modificações neste método para que fossem obtidos três extratos ulvânicos distintos (COSTA *et al.*, 2012).

Para a obtenção do primeiro extrato, o método foi reduzido, de forma que não ocorreu uma purificação adicional, ou seja, não ocorreram os procedimentos de adsorção em carvão ativado e de remoção das proteínas. A alga foi submetida à extração de lipídeos e pigmentos pelo método Soxhlet com a utilização dos solventes diclorometano e etanol. Em seguida, a alga sem lipídeos e pigmentos foi seca e submetida à extração com água quente, o extrato aquoso obtido foi concentrado até a faixa de 10-20% de seu volume inicial, em um evaporador rotativo, e em seguida, foi submetido à precipitação e a liofilização (COSTA *et al.*, 2012).

Para a obtenção do segundo extrato, a alga seca foi submetida aos procedimentos descritos para a obtenção do primeiro extrato, no entanto ocorreu a remoção das proteínas presentes a partir de digestão enzimática com proteinase K e a adsorção em carvão ativado (COSTA *et al.*, 2012).

Para a obtenção do terceiro extrato, a alga seca foi submetida aos procedimentos descritos para a obtenção do segundo extrato, no entanto, também ocorreu a remoção do amido presente através da digestão enzimática com α -amilase, antes da extração do *ulvan*. Costa *et al.* (2012) não informaram os rendimentos dos métodos que foram utilizados para a obtenção dos três extratos de *ulvan* (COSTA *et al.*, 2012).

De acordo com Mao *et al.* (2006), para que os polissacarídeos sulfatados fossem extraídos da alga *Ulva conglobata*, previamente lavada e seca ao ar, primeiramente, esta alga foi mergulhada em 30 volumes de água a temperatura ambiente durante 1 hora e em seguida, foi homogeneizada e refluída por 2 horas na temperatura de 100 °C (MAO *et al.*, 2006).

O extrato aquoso resultante deste procedimento foi submetido à centrifugação para que seja separado dos resíduos da alga e os sobrenadantes foram concentrados em pressão reduzida e em seguida, foram dialisados em tubos de membrana de celulose contra água destilada durante o período de três dias (MAO *et al.*, 2006).

Após a diálise, a retenção foi submetida aos processos de recuperação, concentração em pressão reduzida e precipitação, a partir da adição de 4 volumes de etanol 95 % (v/v) e em seguida, foi lavada duas vezes com etanol absoluto e seca na

temperatura de 60 °C para que um polissacarídeo bruto fosse obtido (MAO *et al.*, 2006).

Este polissacarídeo foi separado em frações através de cromatografia de troca iônica em Q Sepharose Fast Flow e a fração que possuía o carboidrato, que estava presente na maior quantidade, foi purificada através de cromatografia de filtração em gel de Sephacryl S-400/HR. As principais frações foram reunidas e em seguida, foram submetidas aos processos de concentração, dessalinização e liofilização. Após estes processos, o polissacarídeo sulfatado purificado foi obtido na forma de um pó incolor. Mao *et al.* (2006) não informaram o rendimento obtido para este processo de extração (MAO *et al.*, 2006).

Thanh *et al.* (2016), se basearam no método descrito por Mao *et al.* (2006) para realizar a extração do *ulvan*, entretanto substituíram a alga *Ulva conglobata* pela *Ulva lactuca*, sendo que antes deste polissacarídeo ser extraído, a alga, previamente seca e transformada em pó, foi submetida aos processos de remoção de pigmentos e de lipídeos. Além disto, realizaram algumas modificações neste método (THANH *et al.*, 2016).

No método de Thanh *et al.* (2016), 20 gramas da alga *Ulva lactuca* foram submetidos à remoção dos pigmentos e dos lipídeos e em seguida, o material resultante foi adicionado à 400 mL de água. A solução obtida foi agitada de forma contínua na faixa de temperatura de 80-90 °C em banho de água quente durante o período de 2 horas (THANH *et al.*, 2016).

A dispersão aquosa resultante desta etapa da extração do *ulvan* foi submetida à centrifugação e à concentração a partir da redução de seu volume, com a utilização de um evaporador rotativo e em seguida, foi submetida aos processos de centrifugação, filtração e precipitação, com 4 volumes de etanol absoluto. O precipitado resultante foi submetido aos processos de separação, lavagem com etanol por diversas vezes e secagem em uma estufa à vácuo na temperatura de 40 °C (THANH *et al.*, 2016).

Após estes procedimentos, o precipitado foi dissolvido em água destilada e submetido aos processos de diálise contra água destilada e liofilização para que obtivesse um *ulvan* com alta purificação. O rendimento deste polissacarídeo sulfatado, com base na massa da alga utilizada no início do processo (20 g), foi igual a 15 %, uma vez que a massa de *ulvan* extraída foi igual a 3,0 g (THANH *et al.*, 2016).

De acordo com Jaulneau *et al.* (2010), para que o *ulvan* fosse extraído da alga *Ulva spp.*, uma massa de 100 gramas desta alga, previamente lavada com água, foi triturada e em seguida, foi autoclavada durante 2 horas, na temperatura de 90 °C e na pressão de 1,97 atm, em 1 litro de água destilada. Para realizar a filtração do extrato resultante foi utilizada uma tela de nylon com porosidade de 80 µm em um funil de vidro sinterizado com porosidade G2. O filtrado foi submetido ao processo de liofilização e denominado como “extrato bruto” (JAULNEAU *et al.*, 2010).

Este extrato foi submetido à precipitação com 2,5 volumes de etanol durante 48 horas, na temperatura de -20 °C, para que os compostos com elevada massa molecular precipitassem. O sobrenadante e o pellet foram submetidos aos processos de filtração, para serem separados, e de liofilização e em seguida, foram denominados como fração solúvel em etanol e fração insolúvel em etanol, respectivamente. O *ulvan* estava presente na fração insolúvel em etanol, uma vez que os polissacarídeos são insolúveis neste solvente (JAULNEAU *et al.*, 2010).

A fração insolúvel em etanol representava 44% do extrato bruto e seu componente principal era o *ulvan*, entretanto o rendimento deste polissacarídeo em relação a massa inicial de alga utilizada no processo de extração, não foi informado pelos autores (JAULNEAU *et al.*, 2010).

Gajaria *et al.* (2017), se basearam no método de Jaulneau *et al.* (2010) para realizar a extração do *ulvan*, após a remoção dos lipídeos presentes na alga, entretanto substituíram a *Ulva spp.* pela *Ulva lactuca* e realizaram algumas alterações. Desta forma, o resíduo resultante da extração dos lipídeos foi autoclavado em água destilada na temperatura de 90 °C durante o período de duas horas. A mistura foi submetida ao processo de filtração através de um pano de musselina e um papel de filtro de 0,21 µm, após ser arrefecida (GAJARIA *et al.*, 2017).

Após este procedimento, ocorreu a adição de 3 volumes de isopropanol ao filtrado e a mistura resultante foi agitada de forma vigorosa, durante o período de 30 minutos. Os precipitados resultantes da adição de etanol foram recuperados através de uma filtração em pano de musselina e em seguida, foram secos na estufa. Um recipiente selado foi usado para armazenar estes precipitados à temperatura ambiente. O *ulvan* estava presente nestes precipitados. O rendimento obtido neste processo de extração do *ulvan* foi igual a 19,9% (GAJARIA *et al.*, 2017).

Yaich *et al.* (2017) realizaram a extração do *ulvan* da alga *Ulva lactuca*, previamente transformada em pó, através de dois métodos: a extração ácida e a

extração enzimática e química combinada. Para a realização da extração do *ulvan* através do primeiro método, Yaich *et al.* (2017) se basearam no método descrito por Yaich *et al.* (2014) (YAICH *et al.*, 2017).

Para que este polissacarídeo sulfatado fosse extraído a partir do primeiro método, 120 gramas da alga, na forma de pó, foram suspensos em 2 L de uma solução aquosa, que teve o pH ajustado (pH 1,5-2,0), com a utilização de ácido clorídrico 12 M, e em seguida, a suspensão resultante foi submetida ao aquecimento na faixa de temperatura de 80-90 °C e à agitação de 250 rpm durante o período de 1 hora (YAICH *et al.*, 2017).

Para a realização do segundo método, Yaich *et al.* (2017) se basearam no método descrito por Lahaye e Axelos (1993). Desta forma, para que o *ulvan* fosse extraído, ocorreu o preparo de uma solução aquosa quente, na qual ocorreu a adição de celulase e de protease com uma atividade de 700 U/g e 0,8 U/g, respectivamente (YAICH *et al.*, 2017).

Com base no método de Yaich *et al.* (2014), após estes procedimentos, as soluções resultantes dos dois processos extrativos realizados por Yaich *et al.* (2017), foram submetidas ao processo de centrifugação (10.000 rpm / 20 minutos) na temperatura de 10 °C e ao processo de filtração, com a utilização de um filtro de vidro sinterizado com porosidade na faixa de 16-40 µm, para que as impurezas fossem removidas. Em seguida, o líquido resultante da filtração foi submetido ao processo de concentração ($C_{\text{final}} = 5 \cdot C_{\text{inicial}}$), e ao processo de purificação através da utilização da ultrafiltração (Mw 10 kDa, Spectrum) (YAICH *et al.*, 2017).

Para que o *ulvan* fosse recuperado, a solução resultante destes procedimentos foi submetida ao processo de diafiltração, cinco vezes, com a utilização de quatro volumes de água deionizada e em seguida, foi submetida à precipitação com a utilização de quatro volumes de etanol 96 % (v/v). O precipitado resultante foi submetido ao processo de centrifugação (5.000 rpm / 20 minutos) na temperatura de 10 °C, para que fosse recuperado, e foi submetido à secagem em uma estufa de vácuo, na temperatura de 40 °C, até que a sua massa permanecesse constante (YAICH *et al.*, 2017).

Após estes procedimentos, o precipitado seco foi moído. O rendimento do polissacarídeo *ulvan* resultante de diferentes processos extrativos variou de acordo com a faixa de 3,04-17,14%, sendo que o maior percentual corresponde à extração

enzimática e química combinada (LAHAYE; AXELOS, 1993; YAICH *et al.*, 2014, 2017).

De acordo com Le *et al.* (2019) para que o *ulvan* fosse extraído da alga *Ulva pertusa*, 100 g de alga foram previamente triturados para obtenção de um pó fino. O pó obtido foi submetido ao pré-tratamento com 400 mL de etanol 80% em banho-maria na temperatura de 85 °C, durante 2 h, com o intuito de remover os pigmentos e compostos de massa molecular baixa. Após o procedimento de incubação, a dispersão obtida foi centrifugada (4000 g/ 10 min) e o precipitado foi coletado e seco em estufa na temperatura de 50 °C (LE *et al.*, 2019).

Após estes procedimentos, 1 g de alga pré-tratada foi submetido ao processo de extração assistida por micro-ondas com variações no tempo de extração, potência do micro-ondas, relação entre volume de água e massa de alga (mL/g) e pH. Estas variáveis estavam nas faixas de 30-60 min, 500-600 W, 40-70 mL/g e pH 5-7, respectivamente. A dispersão obtida neste processo de extração foi centrifugada (6000 g/ 20 min) com o intuito de separar o extrato aquoso do resíduo insolúvel e em seguida, o extrato aquoso foi submetido à precipitação com etanol até uma concentração final de 85% (LE *et al.*, 2019).

O meio de dispersão resultante da etapa de precipitação foi mantido na temperatura de 4 °C, durante a noite, e centrifugado (6000 g/ 20 min) para a separação do polissacarídeo bruto (*ulvan*). O *ulvan* separado foi seco ao ar durante 12 h, pesado e armazenado na temperatura de -20 °C. Os rendimentos obtidos com as diferentes variações no processo de extração estavam na faixa de 25,71-41,56% (LE *et al.*, 2019).

No método de extração do *ulvan* descrito por Paulert *et al.* (2009), 100 g da alga *Ulva fasciata* seca foram dispersos em 1 L de água destilada e submetidos ao processo de autoclavação durante 2 h na temperatura de 110 °C. Após este processo, a mistura resultante foi submetida à filtração com papel de filtro para que ocorresse a separação da solução aquosa dos resíduos algais e em seguida, esta solução foi submetida à precipitação com 3 volumes de etanol durante 48 h na temperatura de -20 °C (PAULERT *et al.*, 2009).

Os precipitados obtidos foram submetidos ao processo de filtração, para a sua recuperação, e de secagem na faixa de temperatura de 40-45 °C. Os precipitados secos foram dispersos em água destilada e liofilizados, originando a fração de *ulvan*,

constituída pelos polissacarídeos solúveis em água. O rendimento obtido foi igual a 40%, em relação a massa inicial de alga seca (PAULERT *et al.*, 2009).

O resumo dos diferentes métodos de extração do *ulvan*, citados anteriormente, é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Resumo dos diferentes métodos de extração do *ulvan*

Método de extração	Rendimento da extração	Referências
Extração Soxhlet com diclorometano e acetona, extração aquosa (75-85 °C), desproteinização com proteinase K e precipitação com 4 volumes de etanol absoluto	10-20%	Alves <i>et al.</i> (2010)
Extração Soxhlet de acordo com Alves <i>et al.</i> (2010), extração aquosa (75-85°C), digestão enzimática para retirada das proteínas e do amido e precipitação com 4 volumes de etanol absoluto	10-20%	Alves, Sousa e Reis (2013)
Extração Soxhlet de acordo com Alves <i>et al.</i> (2010), extração aquosa (75-90 °C), digestão enzimática com proteinase K e α -amilase precipitação com 4 volumes de etanol absoluto	Não foi informado pelos autores	Barros <i>et al.</i> (2013)
Extração Soxhlet com diclorometano e etanol e obtenção de três extratos ulvânicos diferentes (1° extrato: sem digestão enzimática; 2° extrato: com digestão das proteínas e 3° extrato: com digestão das proteínas e do amido), precipitação dos extratos com 4 volumes de etanol absoluto	Não foi informado pelos autores	Costa <i>et al.</i> (2012)
Extração aquosa e refluxo à 100 °C, diálise em membranas de celulose, precipitação com 4 volumes de etanol, separação das frações a partir de cromatografia de troca iônica e purificação por cromatografia de filtração em gel	Não foi informado pelos autores	Mao <i>et al.</i> (2006)
Extração baseada no método de Mao <i>et al.</i> (2006) com modificações. Extração aquosa (80-90 °C), precipitação com 4 volumes de etanol absoluto e purificação a partir do procedimento de diálises	15%	Thanh <i>et al.</i> (2016)
Extração em autoclave (90 °C/ 1,97 atm) e precipitação com 2,5 volumes de etanol	Não foi informado pelos autores	Jaulneau <i>et al.</i> (2010)
Extração em autoclave (90 °C) e precipitação com 3 volumes de isopropanol	19,9%	Gajaria <i>et al.</i> (2017)
Extração ácida e extração química e enzimática combinada, filtração, purificação a partir da ultrafiltração, diafiltração, precipitação com 4 volumes de etanol 96%	3,04 – 17,14%	Yaich <i>et al.</i> (2017)
Extração em micro-ondas após pré-tratamento com etanol, precipitação com etanol e centrifugação para separação do <i>ulvan</i>	25,71-41,56%	Le <i>et al.</i> (2019)
Extração em autoclave (110 °C), filtração e precipitação com 3 volumes de etanol	40%	Paulert <i>et al.</i> (2009)

Fonte: Elaboração própria.

2.5 Materiais biomiméticos

Os materiais biomiméticos apresentam características baseadas na natureza e nos últimos anos têm chamado atenção dos cientistas (YADAV *et al.*, 2016). Em decorrência do processo de evolução da natureza, os organismos desenvolveram estruturas, texturas ou padrões com diversas funções e sofisticações, de forma espontânea, para assegurar a sua sobrevivência. Desta forma, nos últimos anos, as vantagens destes organismos serviram de inspiração para a síntese de materiais e estruturas biomiméticas (FENG *et al.*, 2017).

Ao realizar a imitação de estruturas e do processo de síntese dos organismos, da escala nanométrica à micrométrica, os cientistas conseguiram sintetizar diversos materiais com estruturas e propriedades inovadoras, como compósitos que apresentam camada com ultra-dureza e rigidez, inspirados no nácar ou madrepérola, materiais que apresentam alta adesão e outros materiais biomiméticos inovadores (FENG *et al.*, 2017).

Os materiais biomiméticos desenvolvidos recentemente apresentam propriedades desejáveis, como biocompatibilidade, presença de uma estrutura porosa, resistência mecânica, capacidade de intumescimento e capacidade de degradação (NGUYEN; CAMCI-UNAL, 2020)

A engenharia de materiais biomiméticos apresenta um grande potencial para desenvolver materiais com funções e estruturas avançadas. O desenvolvimento destes materiais será realizado com a utilização de recursos renováveis e com processos com o uso de água, com o intuito de tentar imitar os processos de química verde presentes nos sistemas biológicos (GUERETTE *et al.*, 2013).

Uma das possibilidades para o uso de recursos renováveis para o desenvolvimento de materiais biomiméticos é a utilização de polissacarídeos extraídos de algas marinhas para a elaboração de sistemas de liberação de fármacos bioinspirados que apresentam a capacidade de fornecer suporte às propriedades mecânicas dos nanomedicamentos e de imitar diversos processos biológicos a partir de interações entre moléculas na escala nanométrica (GESKOVSKI; SAZDOVSKA; GORACINOVA, 2019).

Diversos estudos sobre nanopartículas multifuncionais indicam que estas partículas são eficazes e seguras quando estão presentes em um sistema de liberação constituído por *ulvan*, alginato, *fucoïdan*, carragenina e seus derivados. Este

sistema pode ser utilizado como microambiente bioartificial ou para realizar o diagnóstico e o tratamento de diferentes doenças (GESKOVSKI; SAZDOVSKA; GORACINOVA, 2019).

2.6 Aplicações biomédicas do *ulvan* e vantagens de sua utilização

A utilização do *ulvan* na biomedicina ainda não foi alvo de investigações mais aprofundadas, entretanto este polímero pode ser considerado uma alternativa promissora para as aplicações biomédicas. Até então, nesta área, o *ulvan* tem sido incorporado em *scaffolds* e membranas poliméricas 2D, com o intuito de ser utilizado na engenharia de tecidos e na liberação de fármacos, respectivamente, e aplicado na elaboração de compostos híbridos com alta complexidade e nanofibras associadas a polímeros (TZIVELEKA *et al.*, 2018; MORELLI *et al.*, 2016a).

De acordo com Alves *et al.* (2012), o *ulvan* pode ser utilizado para o desenvolvimento de membranas poliméricas 2D que apresentam o potencial de realizar a liberação do fármaco dexametasona para a cicatrização de feridas, além de atuar como curativo de feridas. Os resultados mostraram que as membranas produzidas apresentaram capacidade de captação de água (até 1800% de sua massa inicial), além de realizar a liberação da dexametasona de maneira sustentada, o que comprova que estas estruturas podem ser utilizadas como sistema de liberação de fármacos na forma de curativos de feridas (ALVES *et al.*, 2012).

De acordo com Alves, Sousa e Reis (2013b), o *ulvan* pode ser utilizado para o desenvolvimento de estruturas porosas 3D, ou *scaffolds*, que apresentam o potencial de serem utilizadas na engenharia de tecidos. Os resultados destes autores mostraram que estas estruturas apresentaram capacidade de captação de água (até 2000% de sua massa inicial) e degradação não citotóxica, entretanto novos estudos serão realizados para a confirmação da viabilidade de utilizar este polissacarídeo sulfatado nesta aplicação biomédica (ALVES; SOUSA; REIS, 2013b).

Os estudos de Massironi *et al.* (2019) mostraram que o *ulvan* também pode ser utilizado como agente redutor e estabilizador biocompatível de nanopartículas de prata. Os resultados destes autores indicam que as nanopartículas obtidas com o *ulvan* apresentaram maior estabilidade do que as nanopartículas obtidas com o ácido cítrico, por exemplo, além de apresentarem atividade antibacteriana contra bactérias gram positivas e gram negativas, o que pode sugerir a viabilidade de se utilizar este

polissacarídeo na produção de compostos antimicrobianos com aplicações biomédicas ou cosméticas (MASSIRONI *et al.*, 2019)

A utilização do *ulvan* apresenta diversas vantagens, entre elas, o fato de este polissacarídeo sulfatado ser proveniente de algas verdes, ser biodisponível, apresentar um processo de extração sustentável e com baixos custos de produção, além de ser uma alternativa para a utilização da biomassa algal abundante, que de outra maneira seria responsável por ocasionar problemas ambientais como a morte de organismos aquáticos por hipóxia (ALVES *et al.*, 2012; MASSIRONI *et al.*, 2019).

Estas vantagens fazem com que a utilização do *ulvan* seja uma alternativa viável à utilização de outros polímeros sintéticos ou de origem animal como o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina, uma vez que apresenta custos de produção inferiores a estes polímeros, além de apresentar diversas aplicações biológicas e biomédicas (ALVES *et al.*, 2012).

2.7 Hidrogel de *ulvan*

O hidrogel de *ulvan* pode ser obtido a partir de diferentes métodos, uma vez que apresenta versatilidade em seu processamento. Além disto, devido a presença de grupos funcionais em sua estrutura, o hidrogel pode ser modificado a partir de reações químicas (POPA; REIS; GOMES, 2015).

Morelli *et al.* (2016b) estudaram a obtenção de um hidrogel de *ulvan* extraído de algas *Ulva sp.* com a utilização da enzima peroxidase de rábano silvestre como catalisador e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como reagente, com o intuito de obter um produto de alto valor agregado para utilização na biomedicina a partir de um processo sustentável (MORELLI *et al.*, 2016b).

A modificação do *ulvan* com tiraminas obteve sucesso ao promover o reconhecimento enzimático e à reticulação a partir do acoplamento oxidativo. Os testes reológicos e biológicos demonstraram que os hidrogéis de *ulvan* podem ser adequados como injetáveis *in situ* formando hidrogéis 3D que são citocompatíveis e podem ser utilizados para liberação celular (MORELLI *et al.*, 2016b)

Kanno *et al.* (2012) desenvolveram um hidrogel de *ulvan* com o intuito de obter um material biocompatível que tivesse a capacidade de realizar troca iônica. Para isto, associaram o *ulvan* à quitosana e obtiveram um hidrogel mais estável em meios ácidos e básicos do que o hidrogel composto de ácido algínico e quitosana. Os estudos de

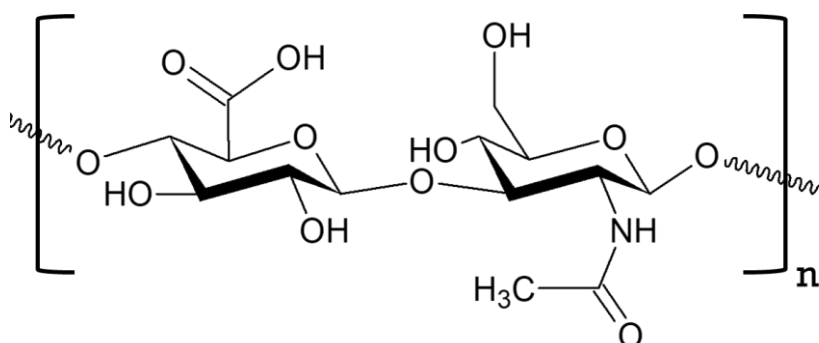
troca iônica realizados com sulfato de cobre (CuSO_4), mostraram que o aumento da concentração de CuSO_4 ocasionou o aumento da adsorção desta substância no hidrogel de *ulvan* e quitosana, o que indica que este sistema pode ser usado como trocador iônico (KANNO *et al.*, 2012).

Entretanto, a partir da realização de estudos paralelos, os autores determinaram que este hidrogel não ocasiona mudanças significativas na coagulação sanguínea ao contrário do que acontece com o hidrogel composto por heparina e quitosana que ocasiona o aumento do tempo de coagulação (KANNO *et al.*, 2012).

2.8 Ácido hialurônico

O ácido hialurônico (Figura 4) ou *hialuronan* é um polímero de glicosaminoglicano de alta massa molar constituído por unidades repetitivas dos açúcares ácido D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina unidos por β -ligações (ADRIEN *et al.*, 2017) e que apresenta uma massa molar (MM) de aproximadamente 400 Da por unidade, que somadas formam uma estrutura linear e espiralada com massa molar relativa de até 10^7 Da (AYA; STERN, 2014). O termo *hialuronan* é utilizado para se referir tanto ao ácido hialurônico quanto ao hialuronato de sódio ou de potássio.

Figura 4 - Estrutura química do ácido hialurônico



Fonte: Elaboração própria.

Na matriz extracelular, o *hialuronan* é essencial para muitos processos celulares, incluindo a remodelagem tecidual. De modo geral, o *hialuronan* é um dos polímeros responsáveis pela manutenção da homeostase e da integridade biomecânica de tecidos (PILLONI *et al.*, 2019) e fluidos que exercem papéis estruturais e lubrificantes, como pele, humor vítreo e fluido sinovial (YILDIRIM *et al.*, 2018).

Entre as aplicações do ácido hialurônico, se encontra a sua utilização no tratamento da osteoartrite, forma mais comum de artrite, com o intuito de promover a manutenção da homeostase e da integridade biomecânica do tecido cartilaginoso articular. Esta manutenção precisa ser realizada, uma vez que esta doença degenerativa ocasiona a inflamação e o desgaste das cartilagens articulares (ZHANG; HUANG, 2012).

O tratamento da osteoartrite com o ácido hialurônico é realizado principalmente para a manutenção das cartilagens articulares do joelho, a partir da via de administração intra-articular. A administração intra-articular do ácido hialurônico tem sido utilizada como tratamento alternativo aos tratamentos com o uso de anti-inflamatórios esteroides e não esteroides, com o intuito de proporcionar a minimização dos efeitos adversos ocasionados por estes fármacos que geralmente são administrados de forma sistêmica (ZHANG; HUANG, 2012).

Devido ao fato de ser um polímero biocompatível que apresenta propriedades físicas viscoelásticas, o ácido hialurônico possui diferentes aplicações clínicas e terapêuticas em ortopedia, oftalmologia, cardiologia, periodontia, dermatologia, dentre outras funções (KIM *et al.*, 2018).

Entretanto, a utilização do ácido hialurônico nas formulações desenvolvidas atualmente, apresenta como principal desvantagem o alto custo deste polímero, o que dificulta a sua utilização em diversos países. Desta forma, uma alternativa para reduzir o custo das formulações seria combinar o ácido hialurônico com outros materiais mais acessíveis financeiramente, de forma que as propriedades do produto final não sejam prejudicadas (CÓRDOVA *et al.*, 2019).

Além disto, existe a possibilidade de tentar substituir o ácido hialurônico pelo *ulvan*, que apresenta custo de produção baixo (ALVES *et al.*, 2012), além de apresentar estrutura química semelhante ao ácido hialurônico (CUNHA; GRENHA, 2016). Entretanto, diversos estudos precisam ser realizados para verificar se o *ulvan* pode ser utilizado como substituto deste polímero de alto custo.

Tradicionalmente, o ácido hialurônico é extraído da crista do galo e de outros tecidos provenientes de animais, entretanto, como o produto obtido apresenta impurezas, o ácido hialurônico precisa ser submetido ao processo de purificação. Este processo é caracterizado por ser lento, poluente e por apresentar alto custo, o que explica o custo elevado do produto final (YAHYAEI *et al.*, 2016).

Além deste processo, este polímero pode ser obtido a partir da fermentação microbiana que pode ser realizada por algumas linhagens de bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus*. A fermentação microbiana é mais vantajosa do que o processo tradicional, uma vez que é um processo mais barato e ecológico, entretanto o ácido hialurônico obtido não apresenta propriedades antibacterianas, o que pode alterar as aplicações *in vivo* deste polímero (YAHYAEI *et al.*, 2016).

Segundo Oe *et al.*, (2016), o *hialuronan* polimérico de alta massa molar (MM) não é absorvido pelas células epiteliais intestinais, mas estes autores não consideraram a rota transepitelial de transporte de macromoléculas como via de acesso à circulação sistêmica (OE *et al.*, 2016).

A maioria dos esforços estão focados em estratégias para aumentar a absorção de polímeros terapêuticos, em vacinas ou fármacos orais, através de células M em placas de Peyer (BRAYDEN; JEPSON; BAIRD, 2005), via de acesso preferencial de macromoléculas, inclusive para o *hialuronan* polimérico. As células M (células microfenestradas) são enterócitos modificados que são localizados principalmente sobre os folículos linfóides presentes na mucosa intestinal, mais conhecidos como placas de Peyer (FASCIANO *et al.*, 2019; JANG *et al.*, 2004).

A superfície do intestino é constituída por uma camada de células epiteliais, unidas fortemente, que formam uma proteção física responsável por impedir que a maior parte dos antígenos ambientais atravessem a barreira intestinal (JANG *et al.*, 2004). Entretanto, a entrada por esta barreira pode ser realizada através de um acesso especial constituído por células M. Estas células são responsáveis pela realização da fagocitose (processo celular de captura de antígenos) e transcitose (processo celular de transporte de macromoléculas) de antígenos e patógenos localizados no lúmen (JANG *et al.*, 2004; MAHARJAN *et al.*, 2016).

Após serem submetidos aos processos de fagocitose e transcitose pelas células M, os antígenos são enviados para a bolsa intraepitelial localizada sob a membrana basolateral, com o intuito de serem processados pelas células provenientes dos tecidos linfóides. As principais células presentes nestes tecidos são as células dendríticas ou macrófagos, que são responsáveis por apresentar os antígenos para os linfócitos T (MAHARJAN *et al.*, 2016).

As células T participam da ativação dos linfócitos B (células responsáveis pela produção de anticorpos contra os antígenos) e esta ativação proporciona uma resposta imune da mucosa intestinal (MAHARJAN *et al.*, 2016).

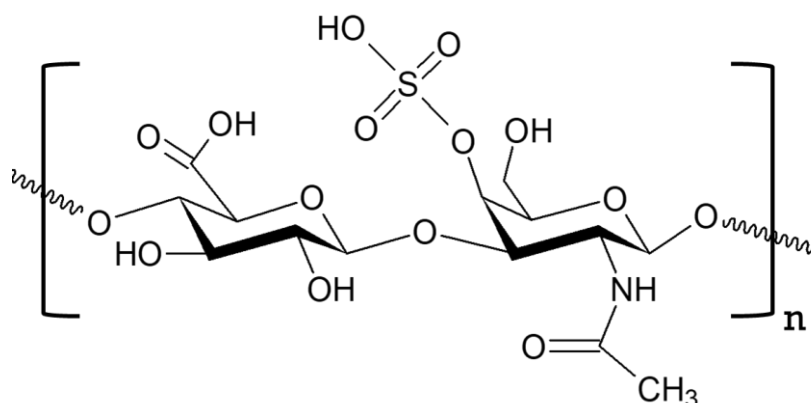
No entanto, a importância dos enterócitos vilosos não deve ser ignorada, uma vez que estas células são mais numerosas do que as células M e também possuem mecanismos de transporte de macromoléculas (CHADWICK; KRIEGL; AMIJI, 2009).

2.9 Sulfato de condroitina

O sulfato de condroitina (SC) (Figura 5) é um polissacarídeo que faz parte da constituição das cartilagens e de outros tecidos corpóreos. Este polissacarídeo apresenta diversas propriedades biológicas que o tornam apto para integrar tecidos, como, por exemplo, a atividade anti-inflamatória, a capacidade de absorver água e nutrientes, a capacidade de proporcionar a melhoria da atividade biológica e da cura a nível celular, o que pode facilitar a restauração da função da articulação que foi atingida pela artrite (WANG *et al.*, 2007).

Entre as aplicações do sulfato de condroitina, se encontra a sua utilização no tratamento da osteoartrite, forma mais comum de artrite, caracterizada pela inflamação e pelo desgaste das cartilagens articulares. Esta doença degenerativa apresenta diversas possibilidades de tratamento, entretanto como este tratamento apresenta efeitos adversos para os pacientes, diversos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de proporcionar a sua otimização, visando a diminuição destes efeitos e o aumento da eficiência do tratamento (ZHANG; HUANG, 2012).

Figura 5 - Estrutura química do sulfato de condroitina



Fonte: Elaboração própria.

A matriz extracelular das células circundantes, presentes principalmente na cartilagem, na pele, nos vasos sanguíneos, nos ligamentos e nos tendões, apresenta em sua constituição, o sulfato de condroitina que é uma glicosaminoglicana (GAG)

natural que apresenta em sua estrutura química a unidade dissacarídica composta pela ligação 1-3 entre o ácido D-glucurônico e a N-acetilgalactosamina (DU SOUICH *et al.*, 2009).

As unidades dissacarídicas que constituem a estrutura química do SC são unidas por β -ligações de 1-4 galactosamina. Os resíduos de galactosamina apresentam grupamentos sulfato nas posições 4 (Δ di - 4S), 6 (Δ di - 6S) ou 4 e 6 (Δ di - 4,6S) que quando são ionizados em conjunto com os grupamentos carboxila presentes no ácido glucurônico, fazem com que o sulfato de condroitina apresente uma carga negativa (DU SOUICH *et al.*, 2009).

O sulfato de condroitina é extraído principalmente de cartilagens provenientes dos resíduos gerados por matadouros e indústrias de pesca. Entretanto, apesar de este polissacarídeo ser obtido a partir do aproveitamento de biomassa animal, o processo de obtenção de sulfato de condroitina purificado apresenta elevado grau de dificuldade e um alto custo (AGUSTIN; WAHYU; YATMASARI, 2016; FERREIRA *et al.*, 2016).

Desta forma, em decorrência do alto custo do sulfato de condroitina purificado, é viável tentar encontrar substitutos para este polímero. Uma possibilidade é a utilização do *ulvan*, uma vez que este polissacarídeo apresenta baixo custo de produção e uma estrutura química semelhante ao sulfato de condroitina (ALVES *et al.*, 2012; CUNHA; GREHA, 2016). Entretanto, é necessário desenvolver estudos para investigar a viabilidade de o *ulvan* ser substituto deste polímero purificado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a viabilidade da utilização da alga marinha *Ulva lactuca*, como fonte do *ulvan* para biomimetizar o efeito do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina.

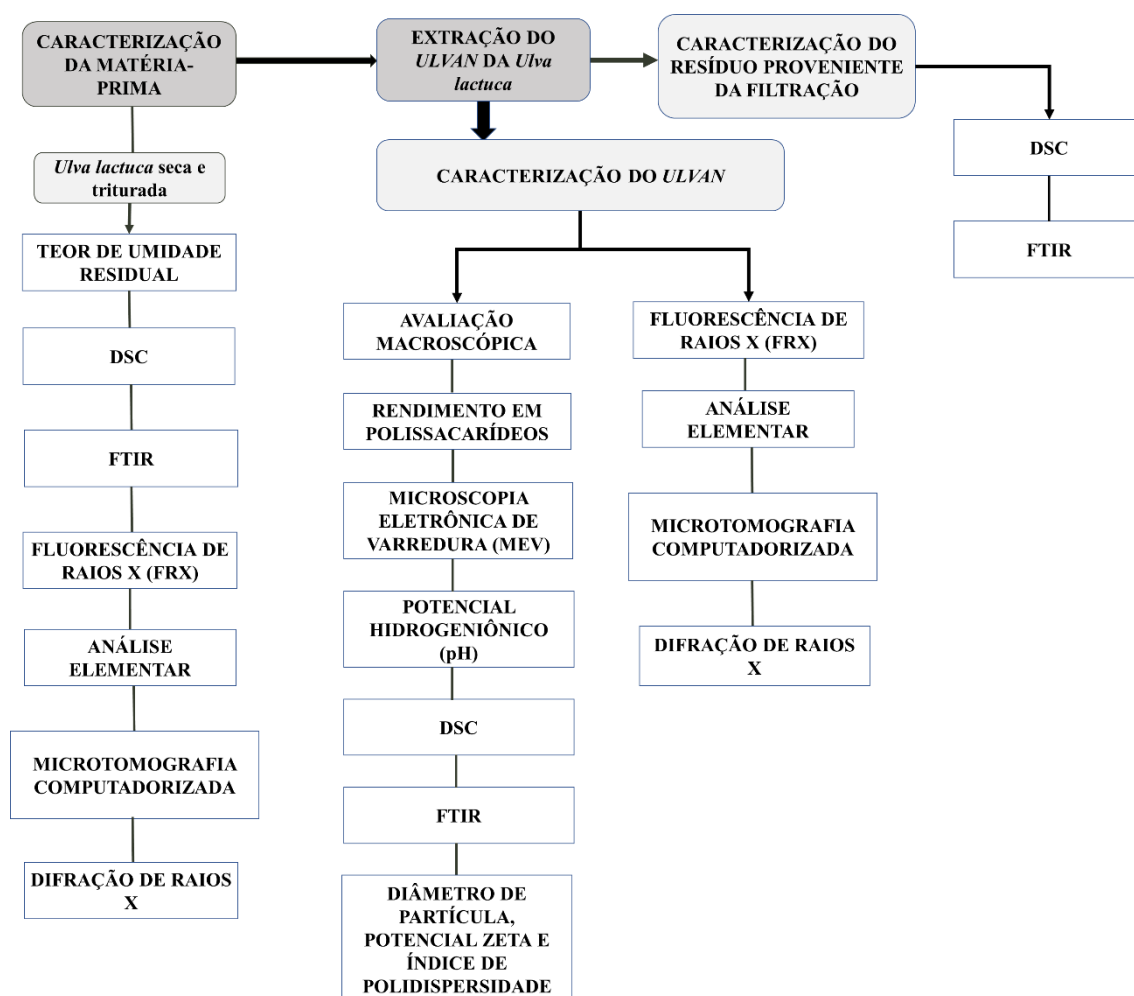
3.2 Objetivos específicos

- Extração e caracterização físico-química do *ulvan*;
- Preparação e caracterização do hidrogel de *ulvan*;

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

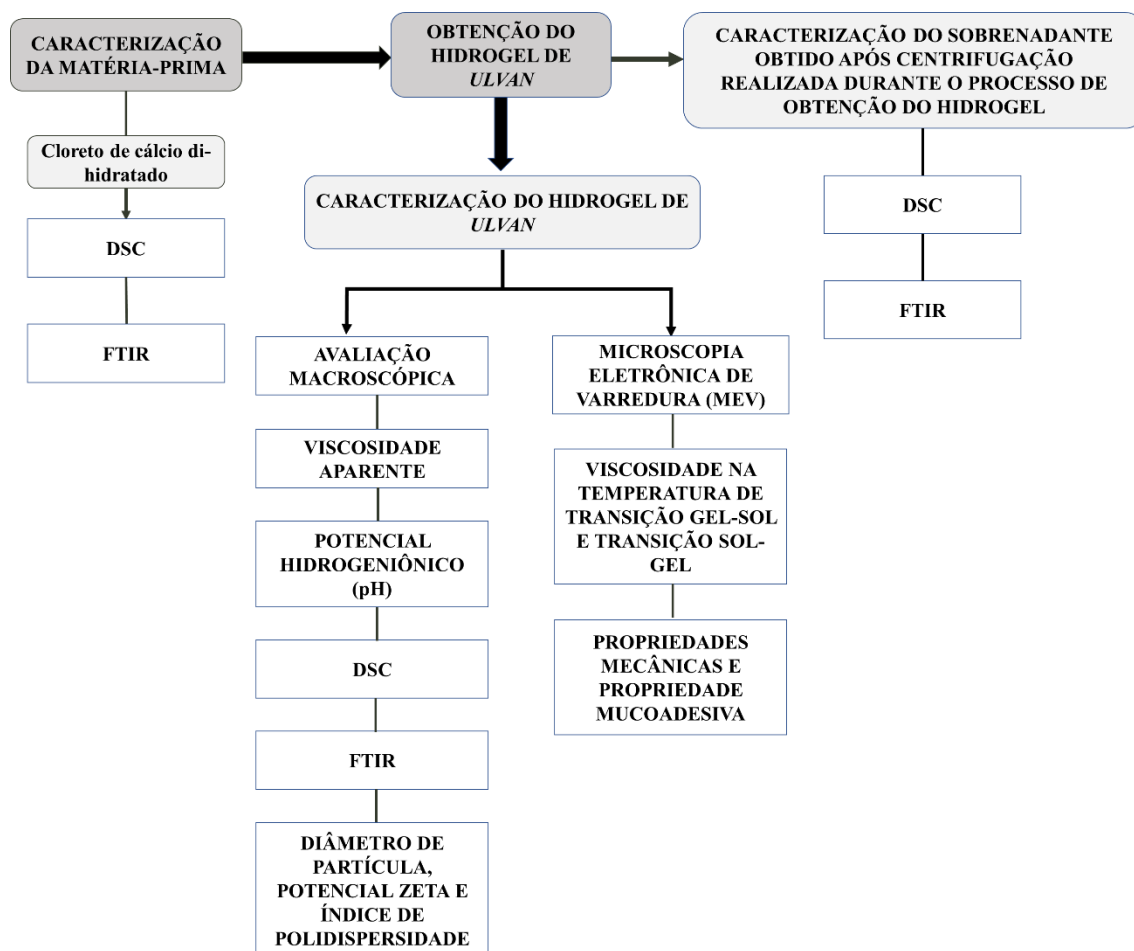
Estudo experimental com material de origem natural, equipamentos para medidas e avaliação das propriedades físico-químicas. Para o desenvolvimento deste trabalho foram realizadas etapas de caracterização da matéria-prima, extração e caracterização do *ulvan* (Figura 6), caracterização físico-química dos resíduos provenientes da filtração e obtenção e caracterização do hidrogel de *ulvan* (Figura 7).

Figura 6 - Diagrama esquemático das etapas envolvidas na caracterização da matéria-prima, extração e caracterização do *ulvan* da *Ulva lactuca* e do resíduo obtido na filtração



Fonte: Elaboração própria.

Figura 7 - Diagrama esquemático das etapas envolvidas na caracterização do hidrogel de *ulvan*, do cloreto de cálcio di-hidratado e do sobrenadante contendo solução de cloreto de cálcio 40%



Fonte: Elaboração própria.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material

A *Ulva lactuca* L. seca foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Ficologia (LAFIC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), campus de Florianópolis. Os demais reagentes para a extração do *ulvan* e para a obtenção do hidrogel de *ulvan* foram adquiridos comercialmente com especificação de padrão analítico.

5.2 Métodos

5.2.1 Determinação do teor de umidade residual e da massa seca da *Ulva lactuca* Linnaeus

Para a determinação do percentual de umidade residual e da massa seca, a alga *Ulva lactuca* seca foi previamente triturada em moinho de facas (O35, Marconi, Piracicaba-SP, Brasil) até a granulometria de 80 mesh. Após este procedimento, a alga foi acomodada em cadinho de alumínio, com diâmetro de 95 mm, e inserida em balança analítica acoplada a um sistema de secagem por radiação infravermelha (MOC63u, Shimadzu, Quioto, Japão).

Os parâmetros de secagem foram mantidos no modo “slow”, com temperatura de 60 °C, variação de massa de 0,05% e precisão de 0,001 g. Após a definição dos parâmetros, a alga foi exposta a radiação infravermelha até massa constante. Após o término da análise, o teor de umidade residual da alga foi registrado e a massa seca foi calculada.

5.2.2 Extração e caracterização física e físico-química do *ulvan*

5.2.2.1 Extração do *ulvan*

A seleção do processo de extração foi fundamentada em transferência de calor e massa, rendimento e preservação dos polissacarídeos. Sete sistemas foram delineados, previamente, e com base na análise dos rendimentos obtidos em cada sistema, ocorreu o delineamento e a padronização do processo de extração do *ulvan*.

Primeiramente, os processos 1 e 2 foram testados com o intuito de avaliar dois métodos de aquecimento na extração do *ulvan*, com base no método descrito por

Paulert *et al.* (2009), com modificações. Nestes testes, a alga *Ulva lactuca* foi submetida ao processo de extração em autoclave durante 2 h 30 min e em micro-ondas durante 30 segundos, e os rendimentos obtidos foram iguais a 8,54% e 17,36%, respectivamente.

A partir destes resultados, foi proposto que o *ulvan* é menos resistente às condições de temperatura e pressão da autoclave, uma vez que a diferença entre os rendimentos obtidos pode sugerir que parte dos polissacarídeos sulfatados presentes na *Ulva lactuca* sofreram degradação durante o processo de extração.

Desta forma, ocorreu a padronização da utilização do micro-ondas como forma de aquecimento, uma vez que este método apresentou o maior rendimento, o que indicou a preservação dos polissacarídeos. Após esta constatação, o processo 2 foi utilizado como base para o desenvolvimento dos demais processos testados, sendo que estes processos apresentaram variações na homogeneização, proporção da dispersão aquosa da alga *Ulva lactuca* e quantidade de ciclos de extração.

Após a padronização do método de aquecimento, ocorreu a avaliação dos resultados dos processos 3, 4, 5 e 6, com o intuito de escolher o melhor método de homogeneização com base em duas características: obtenção do maior rendimento em *ulvan* e ausência de pigmentos característicos da *Ulva lactuca*. Desta forma, o processo 4 foi escolhido porque apresentou a maior eficiência na extração do *ulvan*, com ausência de pigmentos verdes.

Posteriormente, a utilização da homogeneização em Ultra-Turrax foi padronizada e utilizada no desenvolvimento do processo 7. Neste sistema, ocorreu a redução do número de ciclos de extração e o aumento da proporção da dispersão aquosa da *Ulva lactuca* de (1:9) para (1:36), com o objetivo de proporcionar a otimização do processo, a partir da diminuição do tempo de extração e da economia de energia.

A definição de cada sistema e os seus respectivos rendimentos são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Definição e rendimento dos sistemas delineados previamente para a determinação do melhor processo de extração do *ulvan*

Processo	Definição dos processos	Quantidade de ciclos de extração	Proporção da dispersão (alga: água)	Rendimento (%)
1	Extração com aquecimento em autoclave	Extração única	(1:9)	8,54
2	Extração com aquecimento em micro-ondas	Extração única	(1:9)	17,36
3	Extração com aquecimento em micro-ondas sem homogeneização	Extração seriada com quatro ciclos	(1:9)	21,07
4	Extração com aquecimento em micro-ondas com homogeneização em Ultra-Turrax	Extração seriada com quatro ciclos	(1:9)	23,56
5	Extração com aquecimento em micro-ondas com homogeneização em banho ultrassônico	Extração seriada com quatro ciclos	(1:9)	19,06
6	Extração com aquecimento em micro-ondas com homogeneização em agitador mecânico de hélices	Extração seriada com quatro ciclos	(1:9)	21,78
7	Extração com aquecimento em micro-ondas com homogeneização em Ultra-Turrax	Extração única	(1:36)	25,54

Fonte: Elaboração própria.

O processo extrativo do *ulvan* foi delineado e padronizado com base no processo 7, uma vez que este sistema apresentou o maior rendimento, dentre os sete sistemas desenvolvidos.

Para a extração do *ulvan* foi utilizado o procedimento descrito por Paulert *et al.*, 2009, com modificações. Neste processo, 15 g da alga *Ulva lactuca*, previamente seca e triturada na granulometria de 80 mesh, foram dispersos em 540 mL de água purificada (proporção 1:36) e em seguida esta dispersão foi submetida à homogeneização em Ultra-Turrax (T 25 D S32, IKA, Staufen, Alemanha), durante 10 minutos sob agitação de 3400 rpm, para que ocorresse o aumento da área de superfície da alga em decorrência da diminuição do tamanho da partícula.

A dispersão homogeneizada foi aquecida em forno micro-ondas (BMS45A, Brastemp, São Paulo, Brasil) durante 30 segundos com potência média (420 W). Após o aquecimento, a dispersão aquosa foi filtrada em membrana de celulose no funil de

Büchner com auxílio de bomba a vácuo (TE-058, TECNAL, Piracicaba, Brasil), sob a pressão de -600 mmHg.

O resíduo retido na membrana foi seco em estufa com circulação de ar (TE-394/2, TECNAL, Piracicaba, Brasil), na temperatura de 35 °C e triturado em almofariz com auxílio de pistilo até a obtenção de um pó fino para a realização das análises de caracterização físico-química. O extrato aquoso (filtrado) foi submetido à precipitação do *ulvan* com etanol absoluto, na proporção 1:3, em Ultra-freezer (UFR 30, Liotop, São Carlos, Brasil), durante 2 horas na temperatura de -75 ± 5 °C.

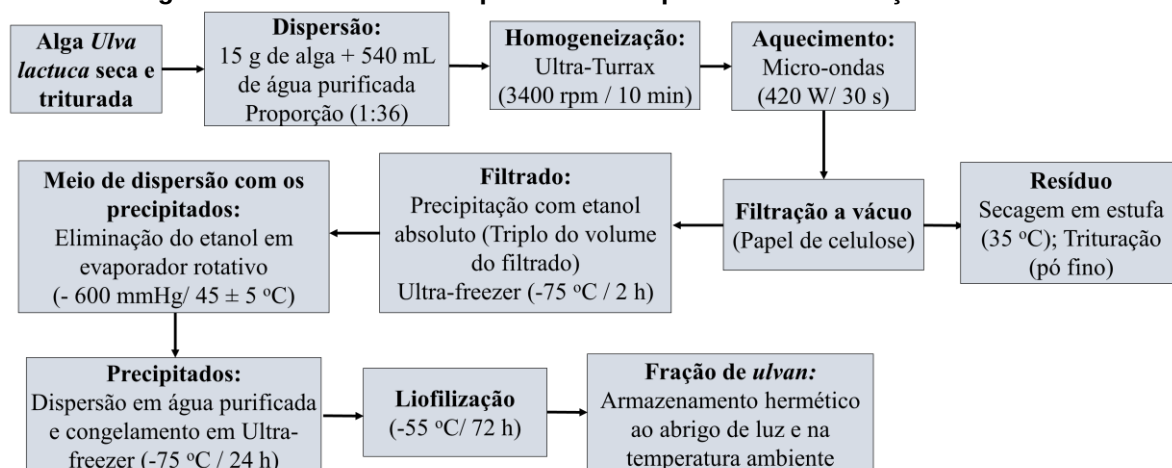
O etanol foi eliminado do meio de dispersão com a utilização de evaporador rotativo (TE-211, TECNAL, Piracicaba, Brasil), na temperatura de 45 ± 5 °C e pressão de -600 mmHg alcançada com bomba a vácuo. O precipitado foi disperso em água purificada, metade do seu volume inicial antes da adição do etanol, e foi congelado em tubos Falcon durante 24 h em Ultra-freezer na temperatura de -75 ± 5 °C.

As amostras foram acondicionadas nestes tubos porque em estudos anteriores foi comprovado que a taxa de congelamento depende do recipiente no qual a amostra é liofilizada, o que pode alterar a estrutura do *ulvan*. Desta forma, a utilização destes recipientes foi padronizada, uma vez que as amostras de *ulvan* liofilizadas nestes tubos apresentaram estrutura floculada, o que facilitou a realização das técnicas de caracterização físico-química.

Após o congelamento, as amostras foram submetidas ao processo de liofilização (L101, Liotop, São Carlos, Brasil), durante 72 horas na temperatura de -50 ± 5 °C. O material resultante da liofilização foi armazenado em embalagem hermeticamente fechada, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

O fluxograma do delineamento experimental do processo de extração do *ulvan* é apresentado na Figura 8.

Figura 8 – Delineamento experimental do processo de extração do ulvan



Fonte: Elaboração própria.

5.2.2.2 Avaliação macroscópica do ulvan, da *Ulva lactuca* seca e triturada e do resíduo obtido na filtração

As características macroscópicas do ulvan obtido após a liofilização, da *Ulva lactuca* seca e triturada e do resíduo obtido na filtração foram registradas e fotografadas. A amostra de ulvan foi avaliada quanto aos aspectos morfológicos: coloração, pigmentação e estrutura.

5.2.2.3 Rendimento em polissacarídeos

Após a pesagem do ulvan, o rendimento em polissacarídeos, expresso em porcentagem, foi calculado com base na massa seca de *Ulva lactuca* L. obtida após a determinação do percentual de umidade desta alga e na massa resultante da liofilização, conforme apresentado na Equação 1.

$$\text{Polissacarídeos (\%)} = \frac{\text{Massa da amostra resultante da liofilização (g)}}{\text{Massa seca de } Ulva \text{ lactuca (g)}} \times 100 \quad (1)$$

5.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Uma pequena porção de ulvan foi disposta em uma fita adesiva de carbono dupla face presa a um stub de alumínio. O suporte foi recoberto com uma fina camada de ouro no metalizador (DII-29010SCTR Smart Coater, JEOL, Tóquio, Japão). A

amostra foi submetida à condição de vácuo, o gás argônio foi liberado como meio que forma o plasma para ionizar a placa metálica de ouro e a corrente foi ajustada para 3 mA, durante 2 min para obter um filme de recobrimento com espessura $\sim 92 \text{ \AA}$.

Em seguida, a amostra foi aleatoriamente microfotografada em microscópio eletrônico de varredura (JSM-IT200, JEOL, Tóquio, Japão) e digitalizada. Para a análise da amostra foi utilizada tensão de aceleração igual 15 kV, conforme protocolo estabelecido no LaFINAU - UNISO.

5.2.2.5 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

A amostra de *ulvan* analisada foi dispersa na proporção 1:40 em água purificada que foi previamente neutralizada até a faixa de pH entre 6,9 e 7,0 com solução de NaOH 0,1 M. A medição do pH foi realizada em peagômetro digital (Tecnal, TEC-5. Piracicaba, Brasil) previamente calibrado com tampões fosfato em pH 4 e em pH 7, na faixa de temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.2.2.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)

A caracterização termoanalítica da alga *Ulva lactuca* seca e triturada, do *ulvan* obtido após a liofilização e do resíduo obtido após a filtração foi realizada com a utilização da técnica de CED (Thermal Analyzer TA 60W – Shimadzu, DSC-60, Quioto, Japão). Nas análises foi utilizado cadinho de alumínio para amostras sólidas, hermeticamente fechado, com aproximadamente 3 mg de amostra usando como referência (branco) um cadinho vazio. O aquecimento foi realizado na faixa de temperatura de 25 a 300 $^\circ\text{C}$, sob uma razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ e em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$.

5.2.2.7 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF)

A caracterização dos grupamentos químicos específicos da alga *Ulva lactuca* seca e triturada, do *ulvan* obtido após a liofilização e do resíduo obtido após a filtração foi realizada a partir da técnica de IVTF (IRAffinity-1S, Shimadzu, Quioto, Japão) com a utilização de modos de transmitância. Os espectros de infravermelho foram obtidos após análise de pastilhas constituídas de brometo de potássio (KBr) e das amostras.

Antes da formação das pastilhas, o KBr foi previamente seco por 2 h em estufa a vácuo (TE-395, TECNAL, Piracicaba, Brasil) na temperatura de 80 °C.

A massa de aproximadamente 2 mg de amostra foi misturada a 300 mg de KBr para formação da pastilha. Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 4000-400 cm^{-1} após 32 varreduras, com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros obtidos foram normalizados e as bandas de vibração foram associadas aos principais grupos químicos de cada amostra.

5.2.2.8 Análise Elementar

A análise elementar da alga *Ulva lactuca* e do *ulvan* foi realizada por combustão com o intuito de obter os percentuais de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre presentes em cada amostra. Para esta análise, a massa de 3-5 mg de amostra foi disposta em analisador elementar (FlashSmart, ThermoScientific, Massachusetts, EUA), foi submetida ao aquecimento até a temperatura de 950 °C e foi mantida nesta temperatura durante 12 minutos. A análise foi realizada em triplicata.

5.2.2.9 Fluorescência de raios X (FRX)

A fluorescência de raios X foi utilizada para realizar a identificação dos elementos químicos e a determinação das concentrações dos átomos (SUPONIK *et al.*, 2018) que estavam presentes na alga *Ulva lactuca* e no *ulvan* obtido após a liofilização. As amostras foram misturadas com celulose e ocorreu a formação de pastilhas com massa de 0,9 g para o *ulvan* (0,1 g de *ulvan* e 0,8 g de celulose) e 1 g para a alga (0,2 g de alga e 0,8 g de celulose).

As pastilhas foram submetidas à análise em espectrômetro de fluorescência de raios X (Epsilon 1, PANalytical, Almelo, Holanda) equipado com ânodo de prata (Ag) (SHAHARYAR *et al.*, 2016) e os resultados foram obtidos com o software Epsilon 3, conforme protocolo estabelecido no LaFINAU - UNISO.

5.2.2.10 Determinação do diâmetro de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidade

Para a realização dos ensaios de determinação de diâmetro de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidade do *ulvan*, o equipamento (NanoBrook 90 Plus PALS, Brookhaven Instruments Corporation, Nova Iorque, Estados Unidos da América) foi ajustado para o comprimento de onda de 661 nm e o ângulo foi fixado em 90°. A amostra foi dispersa em água purificada (Proporção: 1:400) em Ultra-Turrax (T 25 D S32, IKA, Staufen, Alemanha), durante 30 min a 3400 rpm, disposta em célula eletroforética BI-SCP (cubeta de plástico) e analisada em triplicata na temperatura de 25 °C.

A medida do diâmetro de partícula foi obtida a partir do espalhamento dinâmico de luz (EDL), a carga elétrica da superfície das partículas (potencial zeta) foi determinada a partir do espalhamento de luz por análise de fase (ELAF) e a distribuição multimodal dos tamanhos das partículas foi avaliada pelo índice de polidispersidade (SOUZA, 2017).

As medidas de diâmetro de partícula são expressas em nanômetros (nm) e de potencial zeta em milivolts (mV). O índice de polidispersidade não apresenta unidade.

5.2.2.11 Microtomografia computadorizada (μ CT)

A microtomografia computadorizada foi utilizada para avaliar a interconectividade dos poros, o volume de poros abertos, percentual de poros fechados e o grau de anisotropia de pastilhas compostas por 300 mg de amostra. Antes desta avaliação, o *ulvan* e a *Ulva lactuca* foram submetidos, separadamente, ao processo de compressão em uma prensa hidráulica para a formação das pastilhas.

Esta técnica foi utilizada para averiguar o potencial do *ulvan* na formação de estruturas compactadas porosas, uma vez que, em estudo futuros este polissacarídeo pode ser utilizado para a elaboração de *scaffolds* (estruturas porosas 3D), com foco na engenharia de tecidos e sistemas de liberação de fármacos. A *Ulva lactuca* foi analisada com o intuito de ser comparada ao *ulvan*.

As amostras foram avaliadas em microtomógrafo de raios X (microCT - SkyScan 1174, Bruker, Kontich, Bélgica) com scanner de resolução de 28 μ m pixels e tempo de integração de 1,7 segundos. A fonte de raios X foi de 28 keV de energia e

447 μA de corrente. As projeções foram adquiridas na faixa de 180° com um passo angular de 1° de rotação. Ocorreu a obtenção, a visualização e o registro de modelos virtuais em 3D que representavam várias regiões das amostras. O software CT Analyzer (v. 1.13.5) foi utilizado para tratar os dados matematicamente (ALVES *et al.*, 2019). Esta técnica foi realizada conforme protocolo estabelecido no LaFINAU - UNISO.

5.2.2.12 Difração de raios X (DRX)

Uma pequena porção de *Ulva lactuca* e de *ulvan* foi disposta em uma lâmina de vidro e analisada em difratômetro de raios X (D8 advance, Bruker, Massachusetts, EUA) equipado com detector LinxEve do tipo PSD e com fonte de radiação de Cu (Comprimento de onda de 1,5418 $\text{\AA}$). As medidas foram realizadas no intervalo de $10^\circ < 2\theta < 80^\circ$ com um passo de $0,02^\circ$ e tempo de irradiação de 0,5 segundos por passo.

5.2.3 Obtenção e caracterização física e físico-química do hidrogel de *ulvan*

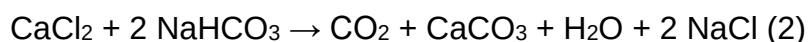
5.2.3.1 Gelificação do *ulvan*

O processo de obtenção do hidrogel de *ulvan* foi baseado nos procedimentos descritos por Bhattarai *et al.* (2006), Li *et al.* (2015) e Alborzi, Lim e Kakuda (2013), entretanto foram realizadas modificações nos métodos utilizados por estes autores (ALBORZI; LIM; KAKUDA, 2013; BHATTARAI *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2015).

Para a gelificação deste polissacarídeo sulfatado, 410 mL de etanol 95% e 8,2 g de cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram adicionados a 2,5 g de *ulvan*. O volume de etanol foi suficiente para cobrir as fibras do *ulvan*. A mistura foi deixada em repouso durante 2 horas em temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$).

O excesso de etanol foi removido por filtração e 315 mL de uma solução de CaCl_2 a 40% (m/v) foi adicionada ao *ulvan*. A mistura foi deixada sob agitação magnética de 1120 rpm (752A, Fisatom, São Paulo, Brasil) durante 2 horas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Em seguida, a dispersão de *ulvan* obtida foi centrifugada durante 20 minutos a 3500 rpm (Rotor LS3/Combate, CELM, São Paulo, Brasil). Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado por decantação.

O material sedimentado foi submetido à lavagem com água purificada com auxílio de funil de Büchner e membrana de nylon de 50 μ para filtração. Após cada lavagem, a água residual foi testada com solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 10% (m/v) para verificar a presença de CaCl_2 no *ulvan* submetido ao processo de gelificação. Na reação entre estes dois sais ocorre a formação de carbonato de cálcio (CaCO_3) que é insolúvel em água, conforme apresentado na Equação 2. Nesta reação um precipitado branco de carbonato de cálcio é formado.



Durante o processo de lavagem com água purificada, o *ulvan* foi homogeneizado com espátula de modo que aos poucos a mistura se tornou homogênea e com característica gelatinosa. Após sucessivas lavagens, o excesso de cloreto de cálcio livre foi eliminado, uma vez que o precipitado branco de carbonato de cálcio parou de ser formado e o hidrogel de *ulvan* foi obtido.

O hidrogel de *ulvan* foi armazenado em embalagem hermeticamente fechada e disposto em geladeira, entretanto, uma parte da amostra de hidrogel foi congelada e liofilizada para a realização dos testes de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Difração de Raios X (DRX), uma vez que estas técnicas exigem a utilização de amostras secas.

5.2.3.2 Avaliação macroscópica do hidrogel de *ulvan*

As características macroscópicas do hidrogel de *ulvan* foram registradas e fotografadas, assim como as características macroscópicas do hidrogel de *ulvan* liofilizado. O hidrogel de *ulvan* foi avaliado quanto aos aspectos morfológicos (coloração e opacidade) e à viscosidade aparente pelo método de inversão de tubo.

Neste método, ocorreu a avaliação da viscosidade aparente do hidrogel mantido em temperatura ambiente durante 2 h e do hidrogel mantido em geladeira, a partir da inversão completa dos tubos, com ausência de agitação, e a partir da inclinação e da inversão completa dos tubos após uma agitação manual branda.

Este procedimento foi baseado nos estudos de Ur-Rehman, Tavelin e Gröbner (2010), com modificações no processo, uma vez que nos testes realizados para a avaliação da viscosidade aparente do hidrogel de *ulvan*, não foram utilizadas rampas de aquecimento e resfriamento (UR-REHMAN; TAVELIN; GRÖBNER, 2010). Entretanto, a viscosidade do hidrogel de *ulvan* foi posteriormente avaliada em um

viscosímetro, com a utilização de rampas de aquecimento e resfriamento, para a determinação da viscosidade do hidrogel nas temperaturas de transição gel-sol e transição sol-gel.

5.2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Uma pequena porção do hidrogel de *ulvan* liofilizado foi disposta em uma fita adesiva de carbono dupla face presa a um stub de alumínio. O suporte foi recoberto com uma fina camada de ouro no metalizador (DII-29010SCTR Smart Coater, JEOL, Tóquio, Japão). A amostra foi submetida à condição de vácuo, o gás argônio foi liberado como meio que forma o plasma para ionizar a placa metálica de ouro e a corrente foi ajustada para 3 mA, durante 2 min para obter um filme de recobrimento com espessura $\sim 92 \text{ \AA}$.

Em seguida, a amostra foi aleatoriamente microfotografada em microscópio eletrônico de varredura (JSM-IT200, JEOL, Tóquio, Japão) e digitalizada. Para a análise da amostra foi utilizada tensão de aceleração igual 15 kV, conforme protocolo estabelecido no LaFINAU - UNISO.

5.2.3.4 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

Para a medição do pH de acordo com o guia de estabilidade de produtos cosméticos (BRASIL, 2004), 1 g do hidrogel de *ulvan* foi disperso em 9 g de água purificada previamente neutralizada até a faixa de pH entre 6,9 e 7,0 com solução de NaOH 0,1 M. As medidas foram realizadas em triplicata na mesma faixa de temperatura de calibração do equipamento. A medição do pH foi realizada em peagômetro digital (Tecnal, TEC-5. Piracicaba, Brasil) previamente calibrado com tampões fosfato em pH 4 e em pH 7, na faixa de temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.3.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)

A caracterização termoanalítica do hidrogel de *ulvan*, do sobrenadante contendo a solução de CaCl_2 40% e do cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) foi realizada com a utilização da técnica de CED (Thermal Analyzer TA 60W – Shimadzu, DSC-60, Quioto, Japão). Para a análise do hidrogel e do sobrenadante, foi utilizado

cadinho de alumínio para amostras líquidas, hermeticamente fechado com 1 mg de amostra usando como referência (branco) um cadinho vazio. O aquecimento foi realizado na faixa de temperatura de 25 a 300 °C sob uma razão de aquecimento de 2 °C.min⁻¹ e em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹.

Para a análise do cloreto de cálcio di-hidratado, foi utilizado cadinho de alumínio para amostras sólidas, hermeticamente fechado, com aproximadamente 3 mg de amostra usando como referência (branco) um cadinho vazio. O aquecimento foi realizado na faixa de temperatura de 25 a 300 °C, sob uma razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ e em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹.

5.2.3.6 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF)

A caracterização dos grupamentos químicos específicos do hidrogel de *ulvan*, do sobrenadante contendo a solução de 40% e do CaCl₂. 2H₂O sólido foi realizada a partir da técnica de IVTF (IRAffinity-1S, Shimadzu, Quioto, Japão) com a utilização do modo de reflectância total atenuada (RTA). Os espectros foram obtidos na faixa de número de onda entre 4000-600 cm⁻¹ após 128 varreduras, com resolução de 4 cm⁻¹. Os espectros foram normalizados e as bandas de estiramentos foram associadas aos principais grupos químicos de cada componente.

5.2.3.7 Difração de raios X (DRX)

Uma pequena porção de hidrogel de *ulvan* liofilizado foi disposta em uma lâmina de vidro e analisada em difratômetro de raios X (D8 advance, Bruker, Massachusetts, EUA) equipado com detector LinxEve do tipo PSD e com fonte de radiação de Cu (Comprimento de onda de 1,5418 ângstrons). As medidas foram realizadas no intervalo de 10° <2θ <80° com um passo de 0,02° e tempo de irradiação de 0,5 segundos por passo.

5.2.3.8 Determinação do diâmetro de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidade

Para a realização dos ensaios de determinação de diâmetro de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidade do hidrogel de *ulvan*, o equipamento

(NanoBrook 90 Plus PALS, Brookhaven Instruments Corporation, Nova Iorque, Estados Unidos da América) foi ajustado para o comprimento de onda de 661 nm e o ângulo foi fixado em 90°. Para a análise, o hidrogel de *ulvan* foi disperso em água purificada (Proporção: 1:400) em Ultra-Turrax (T 25 D S32, IKA, Staufen, Alemanha), durante 30 min a 3400 rpm, disposto em célula eletroforética BI-SCP (cubetas de plástico) e analisado em triplicata na temperatura de 25 °C.

A medida do diâmetro de partícula foi obtida a partir do espalhamento dinâmico de luz (EDL), a carga elétrica da superfície das partículas (potencial zeta) foi determinada a partir do espalhamento de luz por análise de fase (ELAF) e a distribuição multimodal dos tamanhos das partículas foi avaliada pelo índice de polidispersidade (SOUZA, 2017).

As medidas de diâmetro de partícula são expressas em nanômetros (nm) e de potencial zeta em milivolts (mV). O índice de polidispersidade não apresenta unidade.

5.2.3.9 Viscosidade do hidrogel de *ulvan* nas temperaturas Tgel-sol e Tsol-gel

O comportamento de fluxo do hidrogel de *ulvan* foi determinado com a utilização de viscosímetro rotativo digital (Brookfield – DVI Prime, Massachusetts, Estados Unidos da América). A análise foi realizada com o *spindle* SC4-28 e a velocidade de 100 rpm foi mantida constante, de modo que a medida de erro relativo (%torque) devia estar entre 10 e 100% (ALVES *et al.*, 2018a).

Para avaliar a transição de fase gel-sol, a temperatura da água no banho termostaticado (Brookfield – TC 550, Massachusetts, EUA) foi aumentada, gradativamente, de 4 até 40°C, em uma escala de 4 °C a cada 10 min. Para avaliar a transição de fase sol-gel, a temperatura da água no banho foi diminuída, gradativamente, de 40 até 4 °C, em uma escala de -4 °C a cada 10 min. O registro dos resultados para viscosidade (cP) foi realizado usando software Wingather 3.0.

5.2.3.10 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas (dureza, compressão, adesividade e coesividade) do hidrogel de *ulvan* foram analisadas a partir da relação carga (N) x tempo (s). Estas propriedades foram determinadas com a utilização de um probe controlado por software. Para a realização da análise, o analisador de textura (TA.XT Plus, Stable

Micro Systems, Reino Unido). foi previamente calibrado com uma célula de carga com massa igual a 5 kg (ALVES *et al.*, 2018a). A amostra (4 g) foi armazenada em um béquer de vidro de 10 mL e mantida em temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Durante o teste, uma sonda analítica com 10 mm de diâmetro foi comprimida sobre a superfície do hidrogel, com uma força de gatilho de 0,0098 N (0,01 N). Este procedimento foi realizado em triplicata com intervalo de 30 segundos entre as compressões. A velocidade do teste e as velocidades pré-testes e pós-teste foram definidas para uma taxa de $0,50 \text{ mm.s}^{-1}$ e o modo *strain* utilizado foi igual a 10%.

5.2.3.11 Propriedade mucoadesiva

A propriedade mucoadesiva do hidrogel de *ulvan* foi avaliada de acordo com a força necessária para retirar o disco de mucina da superfície do gel. O teste de mucoadesão foi realizado utilizando analisador de textura (TA.XT Plus, Stable Micro Systems, Reino Unido). Os discos de mucina de 8 mm de diâmetro foram preparados por compressão (Lemaq, Máquina compressora rotativa, Mini Express LM-D8, Diadema, Brasil) (ALVES *et al.*, 2018a).

O disco de mucina foi fixado com fita adesiva de dupla face na extremidade inferior da sonda analítica e hidratado previamente por submersão em água purificada durante 1 min. O excesso de água na superfície do disco foi removido com o auxílio de papel absorvente (ALVES *et al.*, 2018a). A amostra de hidrogel foi transferida para uma plataforma adequada e mantida em banho de água com temperatura ajustada na faixa de 37 ± 1 °C.

O disco de mucina fixado na sonda foi comprimido, sobre a superfície da amostra, com uma força de 0,1 N, no sentido apical → basal. O tempo de contato do disco com a superfície da amostra foi padronizado em 180 s. A sonda foi removida da superfície do hidrogel com uma velocidade constante de 10 mm.s^{-1} . A força necessária para destacar o disco de mucina da superfície da amostra foi determinada a partir de uma relação tempo (s) x força (N). A medição foi realizada em triplicata.

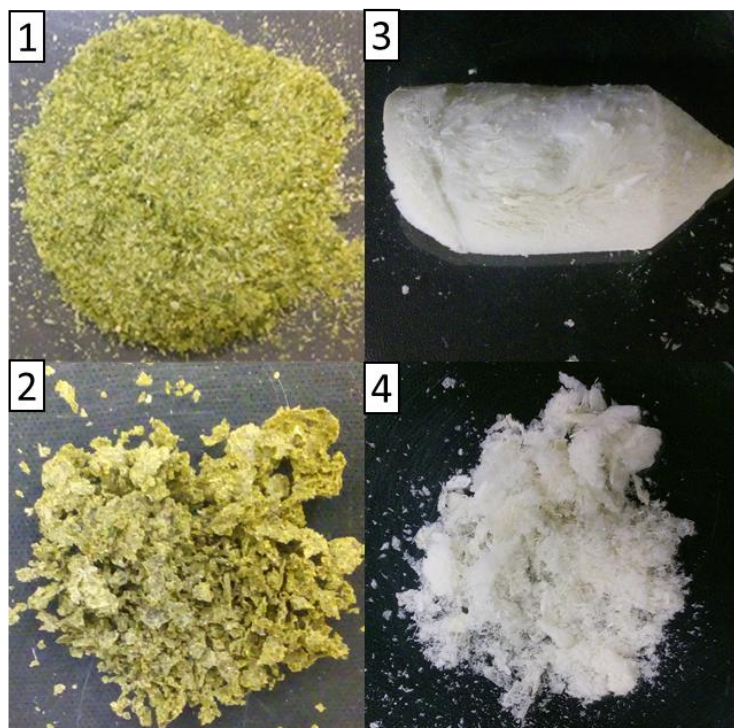
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Extração e caracterização física e físico-química do *ulvan*

6.1.1 Avaliação macroscópica do *ulvan*, da *Ulva lactuca* seca e triturada e do resíduo obtido na filtração

As características macroscópicas do *ulvan*, da *Ulva lactuca* seca e triturada e do resíduo obtido na filtração são apresentadas na Figura 9. Para a realização da liofilização, a amostra de *ulvan* foi acondicionada em tubos Falcon, o que justifica o formato deste polissacarídeo no painel 3. Os resultados mostram que o *ulvan* apresentou estrutura floculada e ausência de pigmentos de tom esverdeado (painel 4). Além disto, após o processo de extração, o resíduo obtido (painel 2) permaneceu com a coloração verde característica da *Ulva lactuca* (painel 1).

Figura 9 - Imagens fotográficas das amostras de *Ulva lactuca* seca e triturada (1); resíduo do processo de filtração antes da trituração (2); *ulvan* liofilizado em tubo Falcon (3) e amostra previamente preparada para a caracterização físico-química (4)



Fonte: Elaboração própria.

6.1.2 Rendimento em polissacarídeos

A massa de *ulvan* extraída a partir da técnica otimizada foi equivalente a 25,54% da massa inicial de *Ulva lactuca*, uma vez que a alga não apresentou umidade residual. Este resultado foi superior aos rendimentos dos outros processos de extração testados (Tabela 2), cujas técnicas foram baseadas na literatura e em geral utilizaram processos seriados com maior gasto de energia e número de operações unitárias. Portanto, a técnica apresentada na Figura 8 é um dos principais progressos obtidos neste estudo até o presente momento.

O rendimento obtido foi superior aos valores obtidos nos métodos descritos por Alves *et al.* (2010), Alves, Sousa e Reis (2013a), Thanh *et al.* (2016), Gajaria *et al.* (2017) e Yaich *et al.* (2017) que apresentaram rendimentos na faixa de 3,04 a 20%, entretanto foi inferior aos resultados obtidos pelo método descrito por Paulert *et al.* (2009) que apresentou rendimento de 40% e pelo método descrito por Le *et al.* (2019) que apresentou rendimento na faixa de 25,71-41,56% (ALVES *et al.*, 2010; ALVES; SOUSA; REIS, 2013a; GAJARIA *et al.*, 2017; LE *et al.*, 2019; PAULERT *et al.*, 2009; THANH *et al.*, 2016; YAICH *et al.*, 2017).

Desta forma, é proposto que o rendimento obtido para o *ulvan* extraído da *Ulva lactuca* foi inferior aos valores obtidos por Paulert *et al.*, 2009 e Le *et al.*, 2019, em decorrência da utilização de espécies de algas diferentes no processo de extração do *ulvan*. Estes autores utilizaram, respectivamente, as espécies *Ulva fasciata* e *Ulva Pertusa*, o que pode estar relacionado aos altos valores de rendimento obtidos.

Esta teoria pode ser comprovada pelo fato de que ao tentar reproduzir os procedimentos descritos por Paulert *et al.*, (2009) para realizar a extração do *ulvan* da *Ulva lactuca*, a partir do primeiro delineamento prévio testado (Tabela 2), o rendimento obtido foi igual a 8,54%. Desta forma, possivelmente o *ulvan* proveniente da alga *Ulva lactuca* sofre mais degradação nas condições de temperatura e pressão da autoclave do que o *ulvan* proveniente da alga *Ulva fasciata*, o que pode explicar a diferença entre os rendimentos obtidos.

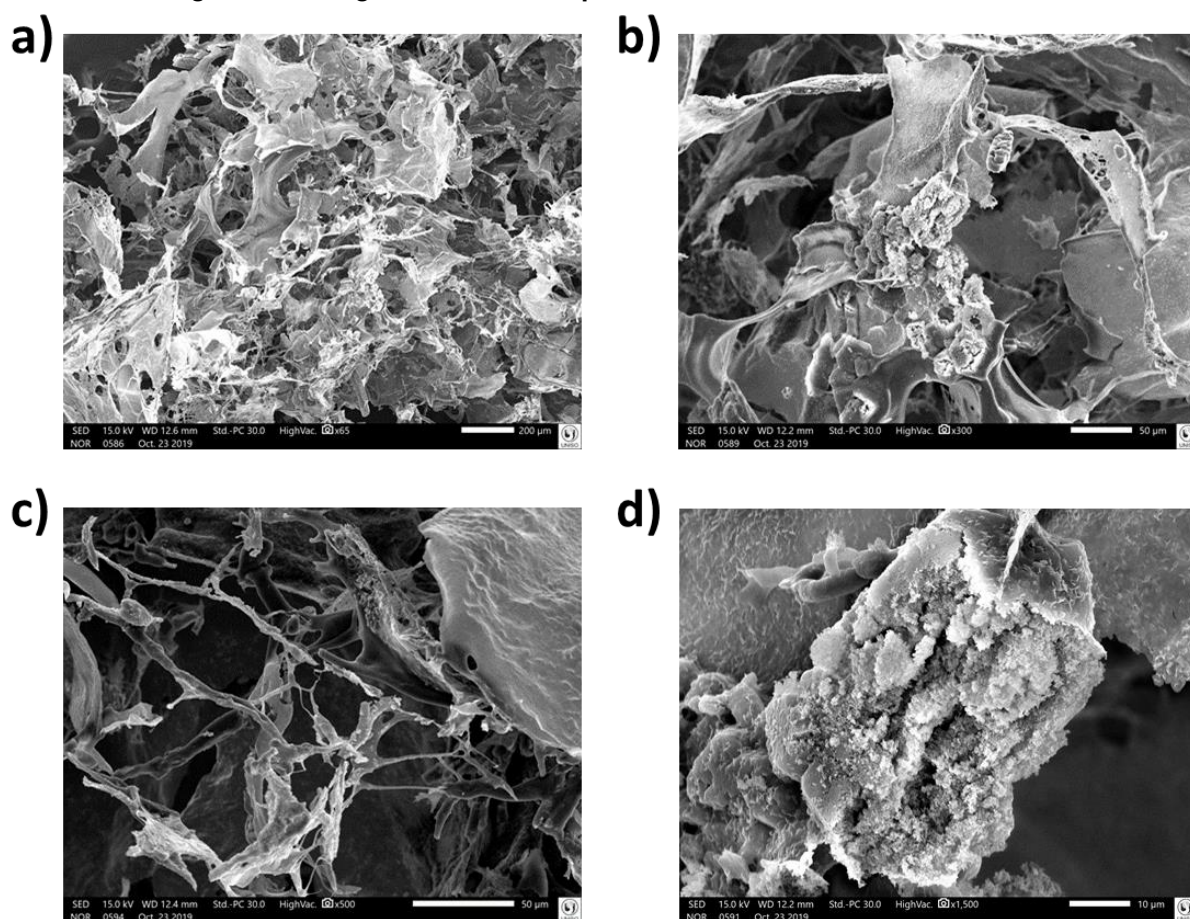
6.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na Figura 10, o *ulvan* pode ser observado, em diferentes ampliações e escalas. Em detalhe, nas Figuras 10a e 10c foram observadas as fibras, os filamentos e os

poros presentes na estrutura deste polissacarídeo. A utilização do MEV foi importante para avaliar com maior nível de detalhamento a estrutura morfológica do *ulvan*, e para futuramente definir estratégias para uso medicinal e cosmético.

Nas Figuras 10b e 10d foram observadas estruturas semelhantes à do *ulvan*, entretanto não apresenta as mesmas características das fibras e filamentos que estão presentes em grande quantidade no polissacarídeo. Esta estrutura pode estar relacionada à presença de magnésio no *ulvan*. Estes elementos químicos podem ser provenientes de conchas que estavam presentes no ambiente aquático em que as algas foram retiradas.

Figura 10 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do *ulvan*



Nota: Microfotografias obtidas por MEV com diferentes ampliações e escalas: a) 65x e 200 µm; b) 300x e 50 µm; c) 500x e 50 µm e d) 1500x e 10 µm.

Fonte: Elaboração própria.

As imagens do *ulvan* obtidas por MEV não se assemelham à imagem obtida por Thu *et al.* (2016) para o *ulvan* extraído da alga *Ulva reticulata*, uma vez que no trabalho destes autores o *ulvan* apresentou uma estrutura semelhante à nuvem/

algodão, desta forma, a presença de fibras, poros e filamentos não foi observada neste polissacarídeo (THU *et al.*, 2016), ao contrário do que ocorreu na análise por MEV do *ulvan* obtido neste trabalho, que apresentou estrutura floculada.

A diferença na estrutura do *ulvan* pode estar relacionada à variação no processo de extração deste polissacarídeo sulfatado e na utilização de uma alga de espécie diferente para a realização da extração.

6.1.4 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

A dispersão aquosa de *ulvan* (1:40) apresentou um valor de pH igual a $6,68 \pm 0,01$. A análise deste resultado indica que este polissacarídeo apresenta característica levemente ácida, que se aproxima da neutralidade (pH 7,0), uma vez que ocasionou uma pequena diminuição do pH da água neutralizada (pH 6,9-7,0). O valor de pH obtido foi superior ao valor de pH obtido por Tsubaki *et al.*, (2014) para uma dispersão aquosa de *ulvan* (1:200).

O valor de pH igual a 5,21, obtido por estes autores, indica que o *ulvan* extraído da *Ulva meridionalis* apresenta característica levemente ácida, porém este polissacarídeo é mais ácido do que o *ulvan* extraído da *Ulva lactuca* (TSUBAKI *et al.*, 2014). A diferença nos valores de pH pode estar relacionada à diferença no processo de extração, a proporção da dispersão aquosa de *ulvan* e à utilização de espécies de algas diferentes para extração do *ulvan*.

6.1.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)

Os termogramas obtidos por CED são apresentados na Figura 11. A análise dos resultados para a *Ulva lactuca* evidencia um evento endotérmico de fusão em 81,9 °C e um evento exotérmico de carbonização em 218,8 °C. A curva correspondente ao resíduo proveniente da filtração apresenta um evento endotérmico em 88,20 °C e um evento exotérmico de carbonização em 209,99 °C.

Os resultados obtidos para a alga *Ulva lactuca* foram diferentes dos resultados descritos por Wang *et al.* (2006) que obtiveram um evento endotérmico de fusão em 66,80 °C e um evento exotérmico de carbonização em 235,52 °C (WANG *et al.*, 2006).

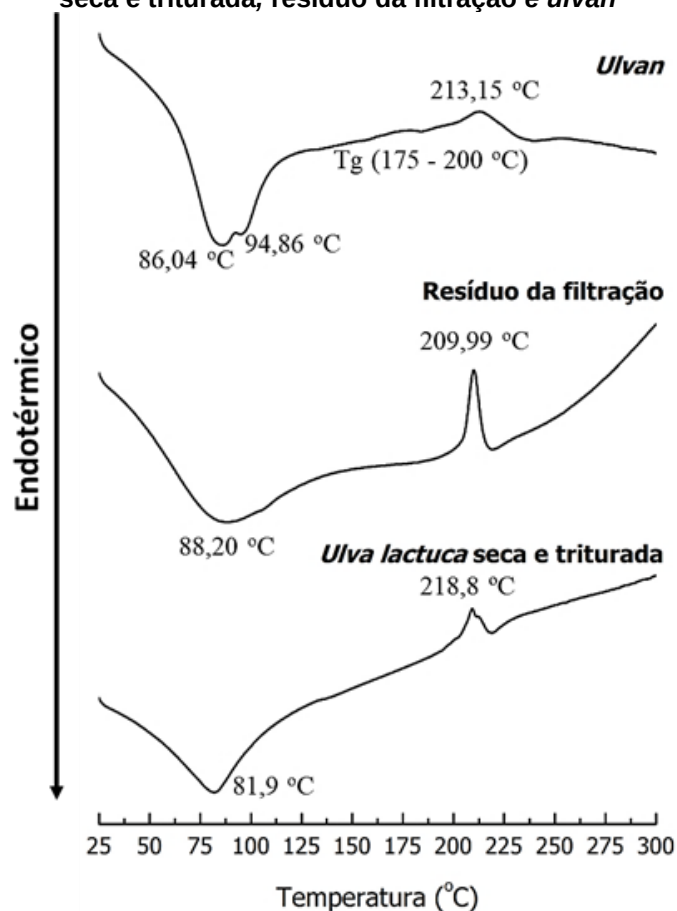
Desta forma, a alga utilizada por estes autores foi submetida à fusão em uma temperatura inferior e à carbonização em uma temperatura superior quando

comparada aos resultados mostrados no termograma da *Ulva lactuca* seca e triturada (Figura 11). Estas diferenças podem estar relacionadas às condições do ambiente aquático no qual as algas foram coletadas e ao processo de tratamento a que foram submetidas antes da análise por CED.

A curva corresponde ao *ulvan* apresenta eventos endotérmicos em 86,04 °C e 94,86 °C, um evento exotérmico de carbonização em 213,15 °C e um evento de transição vítrea (Tg) entre 175 °C e 200 °C. Esta curva é característica de uma substância semicristalina, de forma que a característica semicristalina do *ulvan* foi comprovada por Alves *et al.* (2010), a partir da realização da técnica de difração de raios X (DRX) (ALVES *et al.*, 2010).

O evento de transição vítrea do *ulvan* obtido foi diferente do resultado obtido por Morelli e Chiellini (2010) que apresentou evento de transição vítrea na temperatura de 132,60 °C (MORELLI; CHIELLINI, 2010). Esta diferença pode estar relacionada à diferença no processo de extração do *ulvan*.

Figura 11 - Resultados dos ensaios de calorimetria exploratória diferencial para a *Ulva lactuca* seca e triturada, resíduo da filtração e *ulvan*



Fonte: Elaboração própria.

A acentuação do pico endotérmico do *ulvan* em comparação com a alga *Ulva lactuca* e o resíduo da filtração indica que a energia necessária para que o material fosse submetido à fusão aumentou. A diminuição do pico exotérmico do *ulvan* em comparação com a alga e o resíduo indica que a energia necessária para que a amostra fosse submetida à carbonização diminuiu.

Em comparação com a alga *Ulva lactuca* seca e triturada, ocorreu o aumento do ponto de fusão das amostras liofilizadas e do resíduo da filtração. A presença de dois pontos de fusão na curva do *ulvan* pode estar relacionada à extração de outras substâncias além deste polissacarídeo. Entretanto, visto que os dois picos se encontram antes da temperatura de 100 °C, estes podem estar relacionados à liberação de água em duas temperaturas distintas.

Desta forma, é proposto que a liberação da água livre ocorre em uma temperatura inferior à temperatura necessária para ocasionar a liberação da água ligada presente no *ulvan*, por isto no termograma aparecem dois picos próximos.

Além disto, o termograma deste polissacarídeo sulfatado foi comparado com os resultados de CED, encontrados na literatura, para o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina, com o intuito de investigar se estes polímeros apresentam comportamentos térmicos semelhantes, em decorrência das semelhanças em suas estruturas químicas.

De acordo com os estudos de Ma *et al.* (2012), o ácido hialurônico apresenta um evento endotérmico em 90,6 °C e um evento exotérmico de carbonização em 239,1 °C. O evento endotérmico é próximo aos dois eventos endotérmicos do *ulvan* extraído, entretanto o ácido hialurônico precisa de uma temperatura maior para carbonização (MA *et al.*, 2012).

De acordo com os estudos de Kaur e Kaur (2013), o sulfato de condroitina apresenta um evento endotérmico em 97 °C e um evento exotérmico de carbonização em 239,69 °C. O evento endotérmico é próximo do segundo evento endotérmico do *ulvan* extraído, entretanto o sulfato de condroitina precisa de uma temperatura maior para carbonização (KAUR; KAUR, 2013).

Desta forma, em comparação com o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina, o *ulvan* apresentou diferenças em relação aos picos de fusão e à temperatura de carbonização. Estas diferenças podem ser explicadas pela diferença nas estruturas químicas destes polímeros.

6.1.6 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF)

Os resultados obtidos por IVTF são apresentados na Figura 12. A *Ulva lactuca* antes do processo de extração e o resíduo proveniente da filtração apresentavam estiramentos em comum, entretanto ocorreu o deslocamento dos picos.

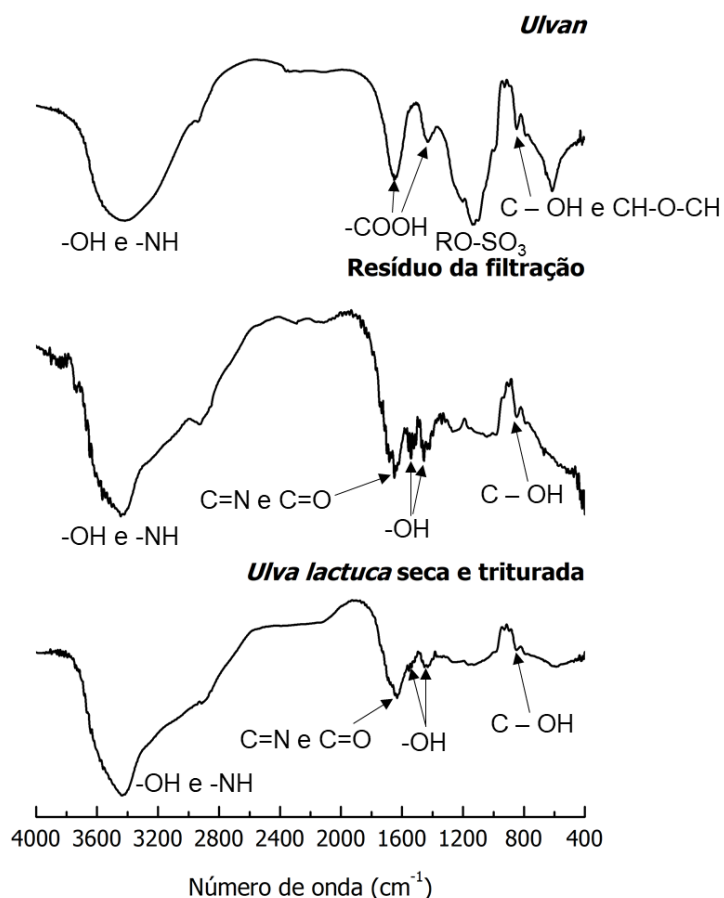
As bandas localizadas na faixa 3422-3417 cm^{-1} são atribuídas aos grupamentos -OH e -NH, os picos localizados na faixa 2930-2914 cm^{-1} são atribuídos à presença de compostos carboxílicos e compostos fenólicos e os picos presentes na faixa 1650-1632 cm^{-1} são atribuídos a presença dos grupamentos C=N e C=O. Os picos presentes nas faixas 1557-1554 cm^{-1} , 1457-1450 cm^{-1} e 1420-1419 cm^{-1} são atribuídos ao grupamento -OH referente a quinina presente na alga *Ulva lactuca* e os picos presentes na faixa 849-846 cm^{-1} são atribuídos à presença da ligação C-OH (BULGARIU; BULGARIU, 2014).

Além disto, é observada a ausência dos picos característicos do *ulvan* nestes materiais, com exceção da banda característica da presença dos grupamentos -OH e -NH e do pico característico da presença da ligação C-OH, que estão localizada em todos os espectros.

A análise dos resultados para o *ulvan* mostra que a banda em 3417,86 cm^{-1} é atribuída aos grupamentos -OH e -NH, os estiramentos em 1647,21 cm^{-1} e 1429,25 cm^{-1} correspondem aos grupamentos carboxílicos (-COOH), o estiramento presente na faixa 1250-1100 cm^{-1} corresponde ao grupo éter sulfato (RO-SO₃⁻), presente em polissacarídeos sulfatados. Os picos presentes na faixa 900-800 cm^{-1} correspondem aos estiramentos das ligações C – OH e CH-O-CH (éter glicosídico) (ALVES; SOUSA; REIS, 2013a).

Como o *ulvan* não apresenta nitrogênio em sua estrutura química, a presença do grupamento -NH no *ulvan* pode estar relacionada à presença de proteínas em conjunto com este polissacarídeo sulfatado, uma vez que este elemento químico é um dos constituintes destas macromoléculas biológicas. Outra justificativa para a presença deste elemento químico no *ulvan*, é o fato de o nitrogênio estar presente no ambiente aquático em que a alga *Ulva lactuca* foi coletada, como um dos nutrientes responsáveis pela proliferação excessiva desta alga.

Figura 12 - Resultados dos ensaios de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier para a *Ulva lactuca* seca e triturada, resíduo da filtração e *ulvan*



Fonte: Elaboração própria.

Os resultados apresentados no espectrograma do *ulvan* são característicos de polissacarídeos conforme descrito por Alves, Sousa e Reis (2013a). A presença do grupamento sulfato (RO-SO_3^-) confirma a forma sulfatada do *ulvan* em relação aos polissacarídeos não sulfatados.

O espectrograma do *ulvan* comparado ao da *Ulva lactuca* mostra que o polissacarídeo foi extraído do vegetal sem danos na sua estrutura química. O resultado sugere que o processo é seletivo para compostos hidrossolúveis, mesmo na presença da força energizante do micro-ondas e que o polissacarídeo sulfatado é seletivamente precipitado pelo etanol. Além disto, o espectrograma do *ulvan* foi comparado com os resultados de IVTF, encontrados na literatura, para o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina.

De acordo com os estudos de Amrutkar e Gattani (2009), o sulfato de condroitina apresenta uma banda em 3436 cm^{-1} atribuída aos grupamentos -OH e -NH, o estiramento em 2923 cm^{-1} corresponde ao grupo metil ou metileno (-C-H), o estiramento em 1039 cm^{-1} corresponde à ligação C-O e o pico em 1636 cm^{-1}

corresponde às bandas de amida. As bandas localizadas em 1413 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} indicam a ausência do grupo carboxila livre e o pico em 1253 cm^{-1} corresponde às vibrações de alongamento da ligação S=O (RO-SO_3^-), que é o pico de absorção característico do sulfato de condroitina (AMRUTKAR; GATTANI, 2009).

Desta forma, o *ulvan* é semelhante ao sulfato de condroitina, uma vez que apresentou o pico característico do grupamento sulfato, além da presença dos grupamentos -OH e -COOH. Além disto, em comparação com o sulfato de condroitina, o *ulvan* não apresentou um pico em 1636 cm^{-1} correspondente ao grupamento amida.

De acordo com os estudos de Yahya et al. (2016), o ácido hialurônico apresenta um pico em $1052,24\text{ cm}^{-1}$ que corresponde ao alongamento C-O-C, um pico em $1412,05\text{ cm}^{-1}$ que indica a combinação das ligações C-O e C=O, um pico em $1653,14\text{ cm}^{-1}$ que confirma a presença do grupamento amida, um pico em $2368,59\text{ cm}^{-1}$ que indica a presença do alongamento C-H e um pico em $3451,07\text{ cm}^{-1}$ que indica a presença do grupamento -OH (YAHYAEI et al., 2016).

Desta forma, o *ulvan* é semelhante ao ácido hialurônico, uma vez que apresentou o grupamento -OH e a ligação CH-O-CH. Além disto, em comparação com o ácido hialurônico, o *ulvan* não apresentou um pico em $1653,14\text{ cm}^{-1}$ correspondente ao grupamento amida.

A ausência do pico correspondente ao grupamento amida era esperada no *ulvan*, uma vez que este grupamento não está presente na estrutura química deste polissacarídeo sulfatado, entretanto está presente tanto no ácido hialurônico quanto no sulfato de condroitina, o que foi confirmado com os resultados de IVTF encontrados na literatura.

6.1.7 Análise elementar

Os resultados da análise elementar, realizada por combustão, do *ulvan* e da *Ulva lactuca* são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados da análise elementar do *ulvan* e da *Ulva lactuca*

	%N	%C	%H	%S
<i>Ulvan</i>	$0,94 \pm 0,04$	$16,04 \pm 0,24$	$3,84 \pm 0,27$	$8,32 \pm 0,29$
<i>Ulva lactuca</i>	$1,38 \pm 0,04$	$24,48 \pm 1,10$	$4,40 \pm 0,24$	$4,80 \pm 0,63$

Fonte: Elaboração própria.

Os resultados obtidos corroboram com os resultados obtidos a partir da técnica de IVTF, uma vez que os elementos químicos nitrogênio, carbono, hidrogênio e enxofre foram identificados nos espectrogramas do *ulvan* e da *Ulva lactuca* na forma de grupamentos químicos.

A *Ulva lactuca* apresentou percentuais de N, C, H e S inferiores aos valores obtidos por Mhatre *et al.*, 2019, que obteve os percentuais de $3,33 \pm 0,02\%$, $26,01 \pm 0,12\%$, $4,90 \pm 0,08\%$ e $5,75 \pm 0,06\%$, respectivamente (MHATRE *et al.*, 2019). Esta diferença pode ser explicada pelas diferenças nas condições do ambiente aquático em que as algas foram coletadas.

O *ulvan* apresentou percentuais de nitrogênio, carbono e enxofre inferiores aos valores obtidos por Alves *et al.* (2010), que obteve os percentuais de $1,50 \pm 0,01\%$ de N, $20,55 \pm 0,09\%$ de C, $3,23 \pm 0,01\%$ de H e $9,07 \pm 0,58\%$ de S (ALVES *et al.*, 2010). Isto pode ser explicado pelas diferenças no processo de extração e na espécie de alga utilizada por estes autores (*Ulva sp.*). Quando comparado à *Ulva lactuca*, o *ulvan* apresentou o aumento do percentual de enxofre e a diminuição dos percentuais de nitrogênio, carbono e hidrogênio (Tabela 3).

O aumento do percentual de enxofre está relacionado ao fato de que este elemento químico é encontrado somente na estrutura do *ulvan* e quando ele está na alga, ele se encontra mais diluído do que quando está na estrutura do polissacarídeo.

A diminuição do percentual dos elementos nitrogênio, carbono e hidrogênio está relacionada ao fato de que estes elementos estão presentes em outras substâncias presentes na alga *Ulva lactuca*, além do *ulvan*, desta forma a concentração destes elementos é maior na alga.

A presença do enxofre comprova que o *ulvan* é um polissacarídeo sulfatado, o que pode ser relacionado com os resultados de IVTF que mostram a presença de um pico correspondente ao grupo sulfato (SO_4^{2-}) presente em sua estrutura.

A presença do nitrogênio (N) pode estar relacionada à presença de proteínas em conjunto com o *ulvan* (ALVES *et al.*, 2010) ou ao fato de que o ambiente aquático em que a *Ulva lactuca* é encontrada apresenta excesso de nutrientes, entre eles, nitrogênio e o fósforo, que ocasionam a proliferação excessiva desta alga. O carbono apresentou o maior percentual no *ulvan* e na *Ulva lactuca* porque ele é o principal constituinte do polissacarídeo sulfatado e da alga marinha.

Além disto, os resultados obtidos para a análise elementar do *ulvan* foram comparados com os resultados de análise elementar, encontrados na literatura, para o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina.

De acordo com os estudos de Sadhasivam *et al.*, (2013), o ácido hialurônico apresenta percentuais de C, H e N, respectivamente, iguais a 29,2%, 4,94% e 1,42%. O percentual de enxofre não foi analisado, uma vez que o ácido hialurônico não apresenta este elemento químico em sua estrutura química (SADHASIVAM *et al.*, 2013).

De acordo com os estudos de Birajdar *et al.*, (2020), o sulfato de condroitina apresenta percentuais de C, H e N, respectivamente, iguais a 26,982%, 4,987% e 2,913% (BIRAJDAR *et al.*, 2020). Além disto, Soll e Harrison (1990) indicaram que o sulfato de condroitina apresenta um percentual de enxofre igual a 7,6% (SOLL; HARRISON, 1990).

Em comparação com o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina, o *ulvan* apresentou percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio inferiores aos resultados obtidos para estas duas glicosaminoglicanas.

A diferença nos percentuais de carbono e hidrogênio está relacionada à diferença no tamanho das cadeias destes polissacarídeos e à presença de grupamentos químicos diferentes em suas estruturas químicas. A diferença estrutural entre estes polissacarídeos é comprovada pelo fato de que o *ulvan* apresenta somente o ácido glucurônico e o grupamento sulfato em comum com o sulfato de condroitina e o ácido glucurônico em comum com o ácido hialurônico (CUNHA; GRENHA, 2016).

A ausência do grupamento amida no *ulvan* explica a diminuição do percentual de nitrogênio deste polissacarídeo sulfatado em comparação com as duas glicosaminoglicanas, que apresentam este grupamento em sua estrutura química.

O *ulvan* apresentou um percentual de enxofre superior ao sulfato de condroitina, entretanto estes valores são próximos. Desta forma, a diferença destes percentuais é atribuída à diferença no tamanho das cadeias destes polissacarídeos.

6.1.8 Fluorescência de raios X (FRX)

Os resultados obtidos para a *Ulva lactuca* e o *ulvan* a partir da técnica de fluorescência de raios X são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados de FRX para a alga *Ulva lactuca* L. e para o *ulvan*

Elementos químicos	Alga <i>Ulva lactuca</i>	<i>Ulvan</i>
Na (ppm)	-	-
Mg (%)	1,1	4,9
Al (ppm)	-	-
Si (%)	0,3	0,2
P (ppm / %)	401,2	0,1
S (%)	2,2	8
Cl (%)	0,3	1,6
K (%)	0,8	2,7
Ca (%)	0,5	0,7
Ti (ppm)	1,1	3,6
Mn (ppm)	51,4	1,4
Fe (ppm)	166,8	76,7
Br (ppm)	226,3	217,4
Rb (ppm)	5,3	8,6
Sr (ppm)	80,1	81,5
C ₆ H ₁₀ O ₅ (%)	94,8%	81,8%

Nota 1: Nome dos elementos químicos encontrados no *ulvan* - Na (sódio), Mg (magnésio), Al (alumínio), Si (silício), P (fósforo), S (enxofre), Cl (cloro), K (potássio), Ca (cálcio), Ti (titânio), Mn (manganês), Fe (ferro), Br (bromo), Rb (rubídio), Sr (estrôncio) e C₆H₁₀O₅ (celulose). Nota 2: ppm (partes por milhão). Fonte: Elaboração própria.

A análise dos elementos químicos presentes na *Ulva lactuca* indicou como maiores constituintes o enxofre (S), o magnésio (Mg), o potássio (K), o cálcio (Ca), o cloro (Cl) e o silício (Si). A presença do enxofre na constituição da *Ulva lactuca* era esperada devido à presença do *ulvan* na parede celular da alga, uma vez que este polissacarídeo apresenta o grupamento sulfato (SO₄²⁻) em sua estrutura química.

A presença do fósforo (P) está relacionada ao fato de que o ambiente aquático em que a *Ulva lactuca* é encontrada apresenta excesso de nutrientes, entre eles, o fósforo e o nitrogênio, que ocasionam a proliferação excessiva desta alga.

A presença de magnésio, potássio, cálcio, manganês, ferro e estrôncio está relacionada à presença de conchas no ambiente marinho em que esta alga foi coletada. Isto é comprovado pelos estudos de Silva *et al.* (2010) que identificaram a presença destes elementos químicos nas conchas presentes na região litorânea de Florianópolis, local onde a alga foi coletada (SILVA *et al.*, 2010).

A presença dos demais elementos pode estar relacionada às demais condições do ambiente aquático em que a *Ulva lactuca* foi coletada e ao processo de lavagem a que foi submetida para a retirada das impurezas, o que pode ser uma explicação para a presença do cloro em sua composição.

A análise dos elementos presentes no *ulvan* indicou como maiores constituintes o enxofre (S), o magnésio (Mg), o potássio (K), o cloro (Cl), o cálcio (Ca), o silício (Si)

e o fósforo (P). A presença do enxofre na estrutura do *ulvan* confirma a forma sulfatada deste polissacarídeo, o que corrobora com o resultado obtido a partir da técnica de IVTF (Figura 12), que mostrou a presença do grupamento sulfato (RO-SO_3^-) na estrutura do *ulvan*.

Além disto, quando a *Ulva lactuca* é comparada ao *ulvan*, foi observado que o percentual de enxofre aumentou de 2,2% para 8%, o que é explicado pelo fato de que este elemento químico é encontrado somente na estrutura do *ulvan* e quando ele está na alga, ele se encontra mais diluído do que quando está na estrutura do polissacarídeo. O aumento do percentual também foi observado para o magnésio, cloro, potássio, cálcio, titânio, rubídio e estrôncio, quando a *Ulva lactuca* foi comparada ao *ulvan*.

A presença do magnésio no *ulvan* confirma a teoria de que nos resultados de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a estrutura que não apresentou as mesmas características das fibras e filamentos do *ulvan* estava relacionada à presença deste elemento químico. O Mg é proveniente de conchas que estavam presentes no ambiente aquático em que a alga foi retirada (SILVA *et al.*, 2010).

O silício, que está presente na alga e no *ulvan*, é um dos constituintes mais importantes do ácido hialurônico e do sulfato condroitina, presentes nos tecidos conjuntivos. Este elemento químico realiza a reticulação biológica e tem um papel na manutenção da estrutura e da resiliência destes tecidos, além de influenciar a calcificação dos ossos (DURU, 2020).

Tanto o *ulvan* quanto a *Ulva lactuca* não apresentam o sódio (Na) e o alumínio (Al) em sua composição química. A ausência do Na pode ser explicada pela retirada do sal marinho (NaCl) da alga durante o processo de lavagem e retirada das impurezas presentes. A ausência do Al pode ser explicada pela ausência deste elemento químico no ambiente aquático no qual a *Ulva lactuca* foi encontrada.

A presença dos demais elementos químicos está relacionada às condições do ambiente aquático em que a *Ulva lactuca* foi coletada, uma vez que estes elementos químicos foram extraídos da alga em conjunto com o *ulvan*.

O percentual de celulose calculado para o *ulvan* e a *Ulva lactuca* apresentou valor elevado, em decorrência do fato de que este polissacarídeo foi utilizado na confecção das pastilhas que foram utilizadas na técnica de FRX. Desta forma, este percentual é referente a soma da massa de celulose adicionada e a massa de celulose que estava presente nas amostras analisadas.

Para o cálculo dos percentuais dos elementos químicos, o software Epsilon 3 considera a diluição da amostra com a celulose e calcula os percentuais de forma correta, ou seja, o cálculo destes percentuais é realizado após a normalização dos resultados, a partir da utilização de um fator de normalização. Os fatores de normalização utilizados para a *Ulva lactuca* e o *ulvan* foram, respectivamente iguais a 1,581 e 1,492.

Não foi possível realizar a comparação dos resultados obtidos com a literatura científica, uma vez que a literatura para este tipo de técnica é escassa no caso do *ulvan* e da *Ulva lactuca*, além disto não foram encontrados estudos com a utilização desta técnica para o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina.

Em comparação com a técnica de análise elementar, a fluorescência de raios X apresentou diferenças no percentual de enxofre das duas amostras analisadas. No caso da *Ulva lactuca*, os percentuais obtidos a partir da técnica de FRX (2%) e análise elementar ($4,80 \pm 0,63\%$) foram diferentes, de forma que a técnica de FRX obteve um valor inferior à metade do percentual obtido a partir da análise elementar.

Isto pode ser explicado pelo fato de que na FRX, as amostras são analisadas de forma pontual, ou seja, uma pequena parte da amostra foi analisada pelo feixe de raios X do equipamento Epsilon 1. Desta forma, como as amostras foram dispersas em celulose para a formação da pastilha analisada, o feixe de raios X pode ter analisado uma área com menor concentração da alga, uma vez que não dá para garantir a homogeneidade completa da amostra na celulose.

Isto pode ter ocasionado variação no resultado quando comparado à análise elementar, que é uma técnica mais confiável por utilizar a amostra pura no processo de combustão para a obtenção dos percentuais de C, N, H e S. O mais indicado seria analisar pastilhas compostas somente pela amostra de interesse, porém a massa de amostra disponível impossibilitou a realização da análise com a amostra pura.

No caso do *ulvan*, o percentual de enxofre obtido por FRX (8%), foi inferior ao percentual obtido por análise elementar ($8,32 \pm 0,29\%$), entretanto os valores encontrados foram muito próximos. Desta forma, é inferido que a homogeneização do *ulvan* com a celulose foi mais eficiente do que a homogeneização da alga com a celulose, uma vez que o resultado obtido se aproximou do resultado obtido a partir da análise da amostra pura.

6.1.9 Determinação do diâmetro de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidade

Os valores obtidos para o diâmetro de partícula (DP), o potencial zeta (PZ) e o índice de polidispersidade (IPD) da dispersão de *ulvan* (1:400) foram, respectivamente, $360,46 \pm 19,37$ nm, $(-) 11,21 \pm 2,26$ mV e $0,303 \pm 0,022$.

A análise dos resultados de diâmetro de partícula e índice de polidispersidade mostra que as partículas presentes na dispersão de *ulvan* apresentaram organização estrutural nanométrica e índice de polidispersidade próximo de 0,3. O resultado obtido para o índice de polidispersidade mostra que o sistema apresentou polidispersidade média, uma vez que o valor obtido foi superior a 0,25, valor máximo para que os sistemas dispersos apresentem homogeneidade nos diâmetros de partículas (CHO *et al.*, 2013).

O resultado de potencial zeta mostra que as partículas apresentaram carga negativa, o que era esperado, uma vez que o *ulvan* é um polissacarídeo aniônico. Desta forma, em meio aquoso (água purificada, pH $7 \pm 0,1$) ocorreu a liberação dos hidrogênios ligados ao grupamento sulfato (RO-SO_3^-) e ao grupamento carboxila ($-\text{COOH}$), o que faz com que as partículas apresentem potencial de superfície negativo.

A dispersão de *ulvan* não apresentou alta estabilidade, uma vez que o valor do potencial zeta não estava de acordo com as condições necessárias para a formação de um sistema com alta estabilidade.

Para que um sistema seja termodinamicamente estável, o potencial zeta tem que apresentar valores relativamente elevados, de preferência, superiores a + 30 mV ou inferiores a -30 mV (PANDOCHI, 2009). Desta forma, em decorrência destes valores de PZ, o sistema apresenta o aumento das forças de repulsão entre as partículas, o que ocasiona a diminuição da tendência de agregação destas partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). No caso da dispersão de *ulvan* isto não foi observado, uma vez que o valor do potencial zeta obtido foi igual a $(-) 11,21 \pm 2,26$ mV.

De acordo com os estudos de Tziveleka *et al.* (2018), os valores obtidos para o diâmetro de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidade de uma dispersão de *ulvan* com concentração de 2,5 mg/mL foram, respectivamente, ~ 400 nm, -26 mV e 1 (TZIVELEKA *et al.*, 2018).

A dispersão de *ulvan* apresentou valores de diâmetro de partícula e índice de polidispersidade menores do que os valores obtidos por Tziveleka *et al.* (2018). Devido ao fato de esta dispersão apresentar polidispersidade média, com IPD próximo de 0,25, a dispersão obtida apresentou maior homogeneidade nos diâmetros de partícula, em comparação com a dispersão desenvolvida por estes autores, uma vez que o resultado de IPD obtido por Tziveleka *et al.* (2018) caracterizou um sistema polidisperso.

Apesar de ser um sistema polidisperso, a dispersão desenvolvida por Tziveleka *et al.* (2018) apresentou uma estabilidade maior do que a dispersão de *ulvan* obtida, uma vez que o potencial zeta obtido por estes autores foi próximo de -30 mV, que é o valor necessário para a formação de um sistema termodinamicamente estável.

As diferenças entre os resultados destas amostras podem ser explicadas pelas diferenças no processo de extração, entre elas, a espécie de alga utilizada, uma vez que Tziveleka *et al.* (2018) utilizaram a alga *Ulva rígida* ao invés da *Ulva lactuca*.

6.1.10 Microtomografia computadorizada

Os resultados obtidos para o volume de interesse (VOI), interconectividade dos poros, volume de poros abertos, percentual de poros fechados e grau de anisotropia das pastilhas de *ulvan* e de alga *Ulva lactuca* são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Características morfológicas e grau de anisotropia das pastilhas de *ulvan* e de *Ulva lactuca*

	<i>Ulvan</i>	<i>Ulva lactuca</i>
Volume de interesse (VOI) (mm³)	31,67	34,88
Interconectividade dos poros (%)	54,46	65,85
Volume de poros abertos (mm³)	17,25	22,97
Poros fechados (%)	0,18	0,13
Grau de anisotropia	0,92	0,96

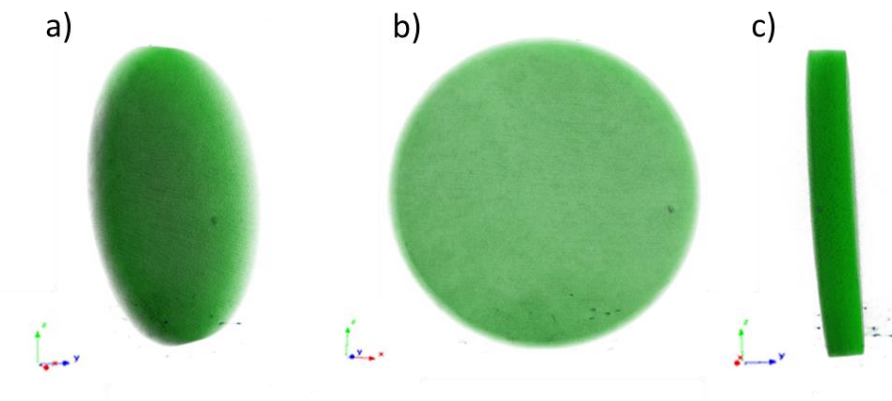
Fonte: Elaboração própria.

A interconectividade dos poros foi igual a 54,46% e 65,85%, respectivamente, para o *ulvan* e a *Ulva lactuca*. Desta forma, os resultados de interconectividade dos poros correspondem aos percentuais de poros abertos presentes nas pastilhas. O volume de poros abertos foi calculado com base no percentual de interconectividade dos poros e no volume de interesse (VOI).

O *ulvan* apresentou o menor percentual de poros abertos e o maior percentual de poros fechados em comparação com a *Ulva lactuca*, desta forma, foi observado que a pastilha composta pela alga apresentou uma porosidade total (percentual de poros fechados + poros abertos) maior do que a pastilha composta pelo *ulvan*. Os poros não puderam ser observados nas Figuras 13 e 14, entretanto, estas imagens foram importantes para a identificação da eficiência de compactação das amostras.

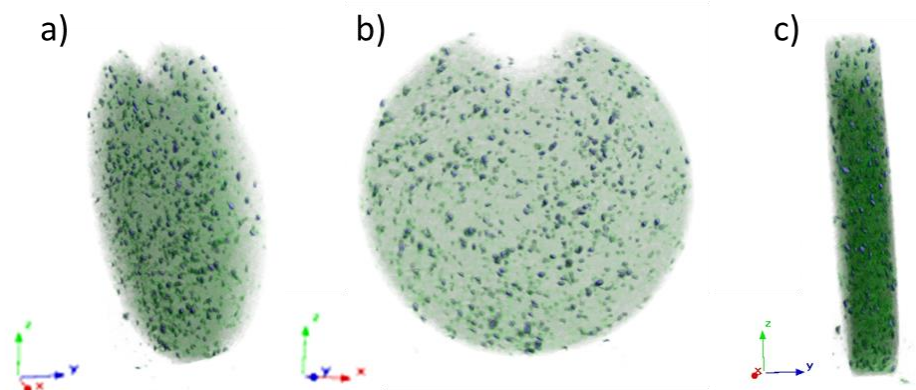
As características morfométricas das amostras compactadas podem ser observadas nas Figuras 13 e 14.

Figura 13 – Características morfométricas da pastilha de *ulvan* avaliadas por microtomografia computadorizada



Nota: a) Vista diagonal do *ulvan* com presença de luz; b) Vista frontal do *ulvan* com presença de luz; c) Vista lateral do *ulvan* com presença de luz.
Fonte: Elaboração própria.

Figura 14 – Características morfométricas da pastilha de *Ulva lactuca* avaliadas por microtomografia computadorizada



Nota: a) Vista diagonal da *Ulva lactuca* com presença de luz; b) Vista frontal da *Ulva lactuca* com presença de luz; c) Vista lateral da *Ulva lactuca* com presença de luz.
Fonte: Elaboração própria.

Desta forma, este teste foi importante para avaliar a capacidade de compactação do *ulvan* em comparação com a *Ulva lactuca*, uma vez que este polissacarídeo sulfatado pode ser utilizado para obtenção de *scaffolds* para aplicação na engenharia de tecidos e sistemas de liberação de fármacos, por exemplo.

Os resultados obtidos indicam que o *ulvan* apresentou maior capacidade de compactação do que a *Ulva lactuca*, uma vez que na pastilha composta por este polissacarídeo foi observado uma homogeneidade maior da amostra. Na pastilha de *ulvan*, as partículas não apresentaram diferença de densidade, o que comprova a eficiência da compactação deste polissacarídeo, uma vez que nenhuma partícula ficou na superfície da pastilha separada das partículas compactadas (Figura 13).

Na pastilha de *Ulva lactuca* foi observado a diferença de densidade nas partículas da alga, uma vez que na compactação, algumas partículas de alga *Ulva lactuca* ficaram na superfície da pastilha, o que explica os pontos escuros mostrados na Figura 14. Estes pontos escuros representam as partículas que não foram submetidas ao procedimento de compactação, em decorrência da diferença de densidade que elas apresentaram em comparação com as demais partículas que foram compactadas de forma eficiente.

Os valores obtidos para o grau de anisotropia foram iguais a 0,92 para o *ulvan* e 0,96 para a alga. Desta forma, as amostras submetidas à compressão em prensa hidráulica formaram estruturas anisotrópicas, uma vez que o grau de anisotropia varia de 0 (estrutura isotrópica) a 1 (estrutura anisotrópica) (ALVES *et al.*, 2018b).

Desta forma, o processo de compressão das amostras originou estruturas compactadas com poros distribuídos de forma heterogênea, ou seja, distribuídos em diversas direções (DOROSZKO; SEWERYN, 2016).

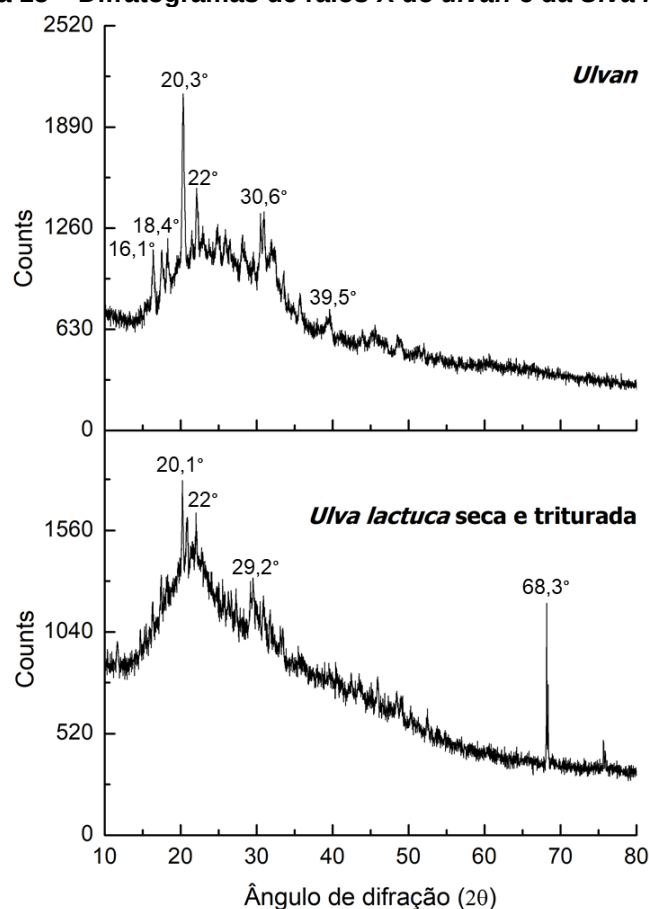
6.1.11 Difração de raios X (DRX)

A difração de raios X foi realizada com o intuito de determinar o grau de cristalinidade do *ulvan* e da alga *Ulva lactuca*. Os resultados para as duas amostras são apresentados na Figura 15. O difratograma da *Ulva lactuca* mostra as principais reflexões cristalinas em 20,1°, 22°, 29,2° e 68,3° e o difratograma do *ulvan* mostra as principais reflexões cristalinas em 16,1°, 18,4°, 20,3°, 22°, 30,6° e 39,5°.

Os resultados obtidos para o *ulvan* são diferentes dos resultados de Alves *et al.* (2010) que mostraram cinco grandes reflexões cristalinas em 13,1°, 23,2°, 26,4°, 32,6° e 39,4°, o que caracteriza um polímero semicristalino (ALVES *et al.*, 2010).

O *ulvan* obtido também foi caracterizado como um polímero semicristalino, uma vez que seu difratograma apresentou uma região amorfa e uma região de picos característicos de substâncias cristalinas (GAO *et al.*, 2020; SANTOS; TAVARES, 2013). O *ulvan* apresentou mais cristalinidade do que a *Ulva lactuca*, uma vez que apresentou mais picos característicos de cristalinidade do que a alga.

Figura 15 – Difratogramas de raios X do *ulvan* e da *Ulva lactuca*



Fonte: Elaboração própria.

6.2 Obtenção e caracterização física e físico-química do hidrogel de *ulvan*

6.2.1 Avaliação macroscópica do hidrogel de *ulvan*

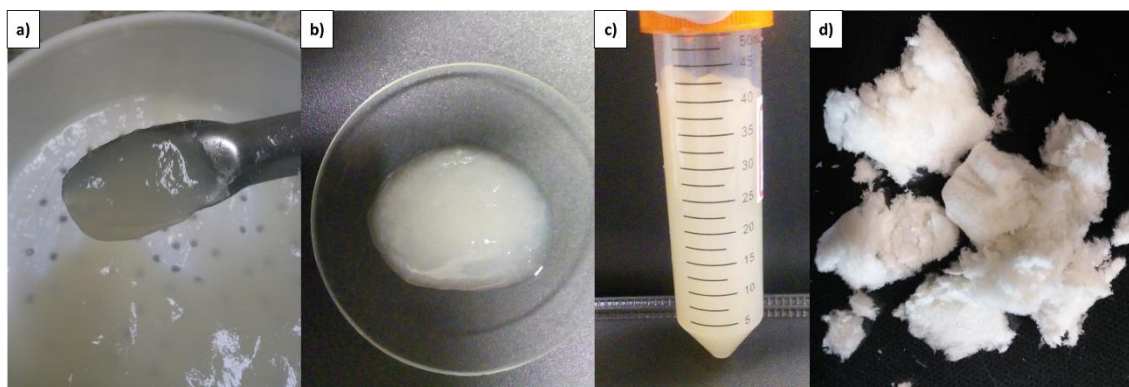
Os aspectos morfológicos e a viscosidade aparente do hidrogel de *ulvan* podem ser observados nas Figuras 16 – 18. O hidrogel obtido apresentou uma coloração amarelada em decorrência da coloração do *ulvan* obtido após a liofilização

(Figura 16a) e apresentou opacidade, uma vez que não apresentou transparência e não permitiu a passagem de luz (Figura 16b).

Com o processo de gelificação do *ulvan*, ocorreu a obtenção da massa de 45 g de hidrogel, a partir de 2,5 g de *ulvan*. Desta forma, a concentração de *ulvan* no hidrogel era igual a 5,5% (m/m). O hidrogel obtido ocupou um volume de aproximadamente 42,5 mL de um tubo Falcon com graduação máxima de 50 mL (Figura 16c).

O hidrogel liofilizado (Figura 16d), apresentou aspectos morfológicos diferentes do *ulvan*, uma vez que não apresentou uma estrutura floculada e sim uma estrutura semelhante a algodão. Esta mudança na estrutura está relacionada a incorporação do cálcio à estrutura do *ulvan* no processo de gelificação com íons Ca^{2+} .

Figura 16 - Imagens fotográficas do hidrogel de *ulvan* após o término do processo de gelificação (a-c) e do hidrogel de *ulvan* após liofilização (d)



Nota: a) Coloração do hidrogel; b) Opacidade do hidrogel; c) Volume obtido para o hidrogel de *ulvan*; d) Hidrogel de *ulvan* liofilizado para a realização das análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios X (DRX).

Fonte: Elaboração própria.

Os aspectos morfológicos do hidrogel obtido são diferentes dos aspectos morfológicos do hidrogel de *ulvan* desenvolvido por Morelli *et al.* (2016a), uma vez que, o hidrogel obtido por estes autores apresentou ausência de coloração e uma opacidade menor (MORELLI *et al.*, 2016a). Isto pode ser explicado pela diferença do processo de extração do *ulvan*, pela concentração de *ulvan* utilizada na obtenção do hidrogel e pelas substâncias químicas utilizadas no processo realizado por Morelli *et al.* (2016a) para a obtenção do hidrogel de *ulvan*.

As diferenças morfológicas também foram observadas quando o hidrogel de *ulvan* obtido foi comparado a hidrogéis constituídos de ácido hialurônico e sulfato de

condroitina. Esta comparação foi realizada, uma vez que este material foi desenvolvido com o intuito de ser avaliado como possível substituto destes polímeros.

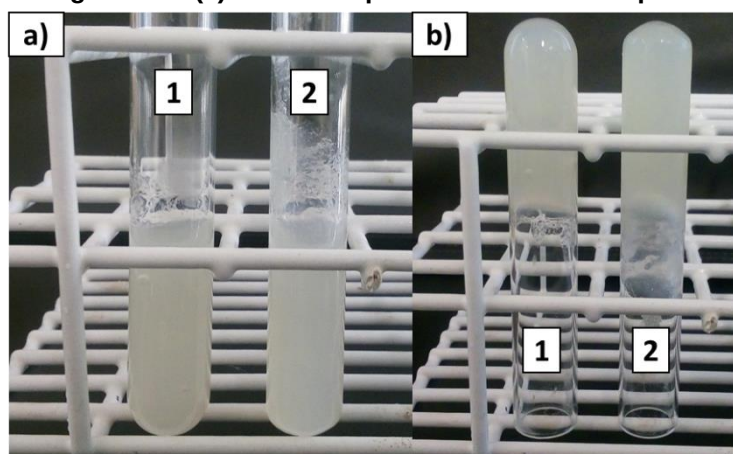
O hidrogel de *ulvan* obtido apresentou diferenças morfológicas com o hidrogel constituído de ácido hialurônico desenvolvido por Koivusalo *et al.* (2019), uma vez que o hidrogel obtido por estes autores apresentou ausência de coloração e transparência (KOIVUSALO *et al.*, 2019). Além disto, este hidrogel também apresentou diferenças morfológicas com o hidrogel constituído de sulfato de condroitina desenvolvido por Gao *et al.* (2018), uma vez que o hidrogel desenvolvido por estes autores apresentou ausência de coloração e uma opacidade menor (GAO *et al.*, 2018).

Estas diferenças são atribuídas às diferenças nas estruturas destes polissacarídeos, a utilização de substâncias químicas diferentes no processo de obtenção dos hidrogéis e principalmente, à coloração amarela do *ulvan* que fez com que o hidrogel de *ulvan* apresentasse esta coloração característica que se diferenciou dos resultados encontrados na literatura.

Na avaliação da viscosidade aparente do hidrogel, ao realizar a inversão completa dos tubos (Figura 17), a diferença no comportamento do hidrogel mantido em temperatura ambiente, durante 2 horas, e do mantido em geladeira, não foi observada, uma vez que nenhuma das amostras se tornou fluida no tubo invertido.

Desta forma, para realizar a avaliação da diferença da viscosidade aparente do hidrogel mantido em temperaturas distintas foi necessário realizar uma agitação manual branda durante os processos de inclinação e de inversão dos tubos, conforme mostrado na Figura 18.

Figura 17 - Imagens fotográficas do hidrogel de *ulvan* mantido a temperatura ambiente (1) e mantido em geladeira (2) antes e depois da inversão completa dos tubos

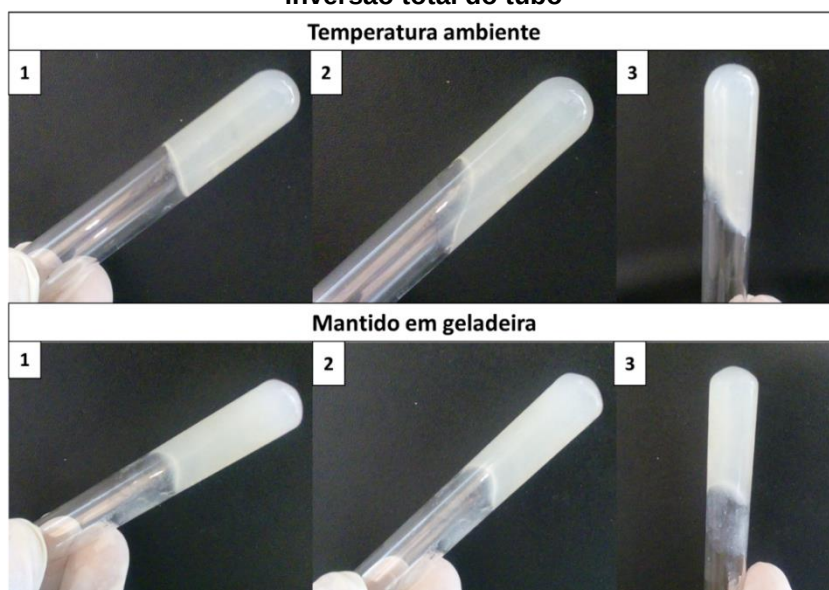


Nota: a) Tubos na posição normal; b) Inversão completa dos tubos.

Fonte: Elaboração própria.

Durante os testes de inclinação dos tubos, com agitação manual branda, seguida da inversão completa dos mesmos foi observado que o hidrogel mantido em temperatura ambiente, durante 2 horas, apresentou uma fluidez maior do que o hidrogel armazenado em geladeira (Figura 18). Desta forma, estes testes mostraram que a viscosidade do hidrogel aumentou com a diminuição da temperatura.

Figura 18 - Imagens fotográficas do hidrogel de *ulvan* após inclinação parcial do tubo e após inversão total do tubo



Nota: 1) Inclinação parcial do tubo; 2) Inclinação parcial do tubo após agitação manual branda; 3) Inversão total do tubo.

Fonte: Elaboração própria.

Durante a realização do teste de inversão total do tubo, foi observado que o hidrogel obtido apresentou característica termorresponsiva assim como o hidrogel de *ulvan* obtido por Morelli *et al.* (2016a). Entretanto, estes autores obtiveram um hidrogel que apresentou o aumento da viscosidade aparente com o aumento da temperatura, ao contrário do hidrogel obtido, que apresentou o aumento da viscosidade aparente com a diminuição desta grandeza (MORELLI *et al.*, 2016a).

Esta diferença pode ser explicada pela utilização de métodos diferentes de obtenção do hidrogel, uma vez que a utilização de substâncias químicas diferentes no processo de gelificação do *ulvan* ocasiona a alteração das propriedades do hidrogel.

O hidrogel obtido também apresentou diferenças em comparação com o hidrogel constituído de ácido hialurônico obtido por Choh, Cross e Wang (2011) e com o hidrogel constituído de sulfato de condroitina obtido por Gao *et al.* (2018). Os hidrogéis obtidos por estes autores também apresentaram características

termorresponsivas, entretanto, a viscosidade aparente destas amostras aumentou com o aumento da temperatura e não com a diminuição desta grandeza (CHOH; CROSS; WANG, 2011; GAO *et al.*, 2018).

Desta forma, visto que o hidrogel de *ulvan* foi desenvolvido com o intuito ser avaliado como possível substituto do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina, estudos precisam ser realizados para alterar as propriedades termorresponsivas deste hidrogel, de forma que o aumento da temperatura ocasione o aumento de sua viscosidade.

Esta alteração precisa ser realizada, uma vez que o aumento da temperatura ocasiona o aumento da fluidez do hidrogel de *ulvan*, o que é um empecilho para a sua utilização como substituto do ácido hialurônico e o sulfato de condroitina no tratamento de cartilagens articulares inflamadas e desgastadas, a partir da via intra-articular, por exemplo.

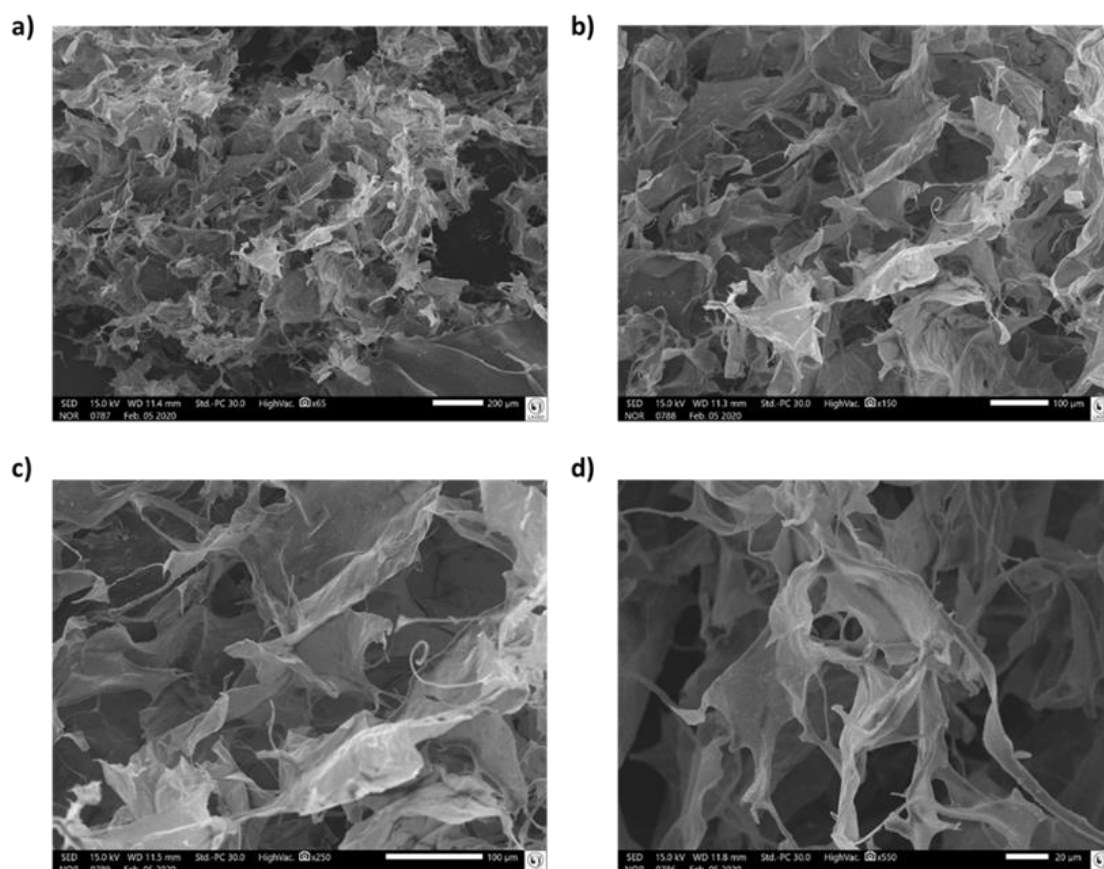
Neste caso, o ideal é que na temperatura ambiente (25 °C), o hidrogel apresente uma viscosidade baixa, para que seja possível realizar a sua aplicação nas cartilagens com injeção intra-articular, e que na temperatura do local de aplicação (37 °C), ocorra o aumento da viscosidade do hidrogel, para que este material apresente a capacidade de permanecer nas cartilagens para a realização de um tratamento eficiente, com o menor número possível de aplicações do hidrogel (CHOH; CROSS; WANG, 2011; GAO *et al.*, 2018).

6.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na Figura 19, o hidrogel de *ulvan* liofilizado pode ser observado em diferentes ampliações e escalas, com detalhe para as fibras presentes na estrutura do hidrogel. A diferença observada na morfologia do hidrogel de *ulvan* comparado com o *ulvan* pode ser explicada pela incorporação do cálcio à estrutura deste polissacarídeo durante a sua reticulação.

O aspecto de reticulação do tipo *sheet* (ou aspecto de folhas) para hidrogel de *ulvan* pode ser explicado pela cristalinidade desta amostra que pode ser confirmada com a observação do evento endotérmico obtido por CED (Figura 20). Este tipo de evento térmico é característico de sistemas organizados.

Figura 19 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura do hidrogel de *ulvan* liofilizado



Nota: Microfotografias obtidas por MEV com diferentes ampliações e escalas:: a) 65x e 200 μm; b) 150x e 100 μm; c) 250x e 100 μm; d) 550x e 20 μm.

O hidrogel obtido foi comparado com os resultados de MEV do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina, encontrados na literatura, uma vez que este material foi desenvolvido com o intuito de ser avaliado como possível substituto destes polímeros.

O hidrogel de *ulvan* obtido apresentou diferenças morfológicas em comparação com o hidrogel constituído de ácido hialurônico desenvolvido por Palumbo *et al.* (2010), uma vez que apesar de apresentar característica fibrosa e apresentar o aspecto de reticulação do tipo *sheet* em parte de sua estrutura, o hidrogel obtido por estes autores foi caracterizado pela presença de diversos microporos interligados por nanofibrilas (PALUMBO *et al.*, 2010). Esta característica não foi observada no hidrogel de *ulvan*, uma vez que este hidrogel apresentou poucos poros em sua estrutura.

Em comparação com o hidrogel constituído de sulfato de condroitina desenvolvido por Bai *et al.* (2017), o hidrogel de *ulvan* apresentou diferenças morfológicas, uma vez que o hidrogel obtido por estes autores não apresentou aspecto de reticulação do tipo *sheet* e apresentou uma estrutura com diversos microporos interconectados (BAI *et al.*, 2017).

Estas diferenças morfológicas podem ser explicadas pelas diferenças existentes na estrutura química destes três polissacarídeos e pelas diferenças existentes no processo de obtenção dos hidrogéis, uma vez que as substâncias químicas utilizadas no processo de reticulação destes polissacarídeos têm papel importante na formação da estrutura do hidrogel.

6.2.3 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

A dispersão do hidrogel de *ulvan* em água purificada e neutralizada (1:10) apresentou um valor de pH igual a $10,39 \pm 0,02$. A análise deste resultado indica que a adição de cloreto de cálcio durante o processo de gelificação do *ulvan* ocasionou o aumento do pH deste polissacarídeo, uma vez que o hidrogel apresentou pH alcalino e a dispersão aquosa de *ulvan* apresentou um valor de pH igual a $6,68 \pm 0,01$ que se aproximou da faixa de pH neutro $7,0 \pm 0,1$.

O hidrogel de *ulvan* precisa apresentar um valor de pH próximo ao pH do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina, uma vez que este material foi desenvolvido com o intuito de ser avaliado como possível substituto destes polímeros. Visto que a literatura científica apresenta diversos estudos sobre a utilização do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina para a recuperação de cartilagens inflamadas, o hidrogel obtido foi comparado com os resultados encontrados na literatura para o valor de pH indicado para o tratamento da inflamação deste tecido cartilaginoso.

Nos estudos de Lu *et al.* (2019), um hidrogel de ácido hialurônico foi obtido com o intuito de realizar a liberação de fármacos para o tratamento de cartilagens inflamadas. Para isto, o hidrogel obtido por estes autores apresentou a característica de ser responsivo ao pH, de forma que em pH 6 (característico de cartilagens inflamadas), o hidrogel proporcionou a liberação dos fármacos anti-inflamatórios, e em pH 7,4 (característico de cartilagem normal e curada), o hidrogel sofreu degradação, uma vez que a cartilagem foi submetida ao tratamento com o fármaco e voltou a apresentar as suas características normais (LU *et al.*, 2019).

Desta forma, para que o hidrogel de *ulvan* seja utilizado para aplicação em cartilagens inflamadas, por exemplo, este material precisa apresentar valor de pH próximo a 6,0 que corresponde ao pH desta região, durante o processo de inflamação, uma vez que se o pH deste material apresentar característica alcalina ou ácida, o

hidrogel pode até mesmo proporcionar a piora da inflamação das cartilagens (LU *et al.*, 2019).

Além disto, após a liberação dos fármacos em pH 6 e da recuperação da cartilagem, o hidrogel precisa sofrer degradação em pH 7,4, que é o valor de pH da cartilagem após o processo de cura, em decorrência da liberação de fármacos anti-inflamatórios (LU *et al.*, 2019).

Em decorrência do fato de que o hidrogel de *ulvan* obtido apresentou valor de pH igual a $10,39 \pm 0,02$, este hidrogel não é adequado para liberação de fármacos em cartilagens inflamadas, uma vez que pode ocasionar a alteração do pH das cartilagens e até mesmo a piora da inflamação. Desta forma, estudos precisam ser realizados com o intuito de diminuir o pH deste hidrogel, de modo que sua estabilidade não seja prejudicada, e com o objetivo de obter um hidrogel pH-responsivo para possibilitar a liberação de fármacos anti-inflamatórios nas cartilagens, de acordo com os estudos de Lu *et al.* (2019).

Para verificar a possibilidade do hidrogel de *ulvan* ser utilizado para aplicação em cartilagens inflamadas, será necessário realizar testes de estabilidade para avaliar se o hidrogel se mantém estável em pH 6 e testes para verificar se neste pH, o hidrogel vai proporcionar a liberação sustentada de fármacos anti-inflamatórios, além de ser submetido à degradação em pH 7,4.

6.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)

Os resultados obtidos por CED são apresentados na Figura 20. A análise dos resultados para hidrogel de *ulvan* evidencia um evento endotérmico de fusão em 109,35 °C. Em comparação com o *ulvan*, o hidrogel apresentou ponto de fusão superior aos dois eventos endotérmicos de fusão deste polissacarídeo, 86,04 °C e 94,86 °C. Além disto, o hidrogel é mais estável que o *ulvan*, uma vez que não apresentou nenhum evento térmico de carbonização.

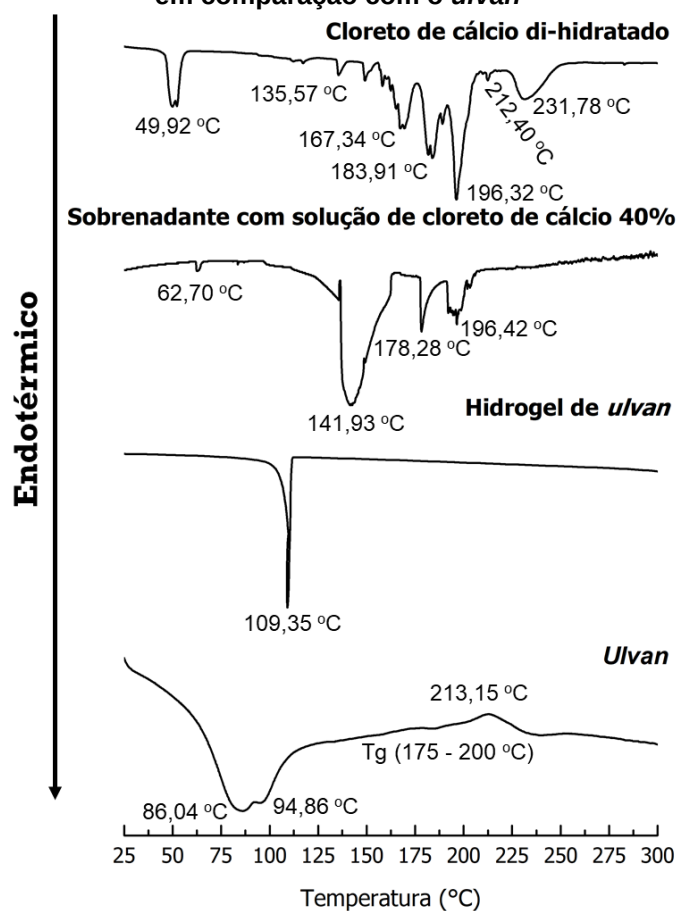
O evento térmico do hidrogel de *ulvan* caracteriza uma substância cristalina ao contrário do *ulvan* que apresenta característica semicristalina, o que foi comprovado pela análise dos resultados de DRX do *ulvan*. Desta forma, o processo de gelificação do *ulvan* promoveu alteração na cristalinidade deste polissacarídeo.

A cristalinidade do hidrogel é comprovada pela análise dos resultados de MEV que mostraram a presença de estruturas com aspecto de reticulação do tipo *sheet* (aspecto de folhas) que são características de substâncias cristalinas.

A curva correspondente ao sobrenadante com solução de cloreto de cálcio 40% evidencia eventos endotérmicos em 62,70 °C, 141,93 °C, 178,28 °C e 196,42 °C. A análise dos resultados do cloreto de cálcio evidencia eventos endotérmicos em 49,92 °C, 135,57 °C, 167,34 °C, 183,91 °C, 196,32 °C e 231,78 °C.

O sobrenadante e o cloreto de cálcio sólido apresentaram dois eventos endotérmicos em temperaturas na faixa de 177-197 °C, o que pode indicar que estes pontos de fusão são característicos do cloreto de cálcio que estava presente nas duas amostras analisadas, porém em formas diferentes.

Figura 20 - Resultados dos ensaios de calorimetria exploratória diferencial para o hidrogel de *ulvan*, o sobrenadante com solução de cloreto de cálcio 40% e o cloreto de cálcio di-hidratado em comparação com o *ulvan*



Fonte: Elaboração própria.

Além disto, o termograma do hidrogel de *ulvan* foi comparado com os resultados de CED, encontrados na literatura, para o ácido hialurônico e o sulfato de

condroitina, com o intuito de investigar se o hidrogel obtido apresenta comportamento semelhante aos hidrogéis destes polissacarídeos, uma vez que este material foi desenvolvido com o intuito de ser avaliado como possível substituto destes polímeros.

De acordo com os estudos de Ma *et al.* (2012), o ácido hialurônico apresenta um evento endotérmico em 90,6 °C e um evento exotérmico de carbonização em 239,1 °C. O evento endotérmico é próximo do evento endotérmico obtido para o hidrogel de *ulvan*, entretanto o hidrogel não apresentou evento térmico de carbonização (MA *et al.*, 2012).

De acordo com os estudos de Kaur e Kaur (2013), o sulfato de condroitina apresenta um evento endotérmico em 97 °C e um evento exotérmico de carbonização em 239,69 °C. O evento endotérmico é próximo do evento endotérmico obtido para o hidrogel de *ulvan*, entretanto o hidrogel não apresentou evento térmico de carbonização (KAUR; KAUR, 2013).

O ácido hialurônico e o sulfato de condroitina apresentaram um pico exotérmico de carbonização em decorrência do fato de apresentarem característica semicristalina, ao contrário do hidrogel de *ulvan* que apresentou característica cristalina. Desta forma, em comparação com estes dois polímeros, o hidrogel de *ulvan* apresentou diferenças em relação aos picos de fusão e à presença de evento térmico de carbonização. Estas diferenças podem ser explicadas pela diferença nas estruturas químicas destes polissacarídeos e pelo processo de reticulação do *ulvan* que ocasionou o aumento da cristalinidade do *ulvan*.

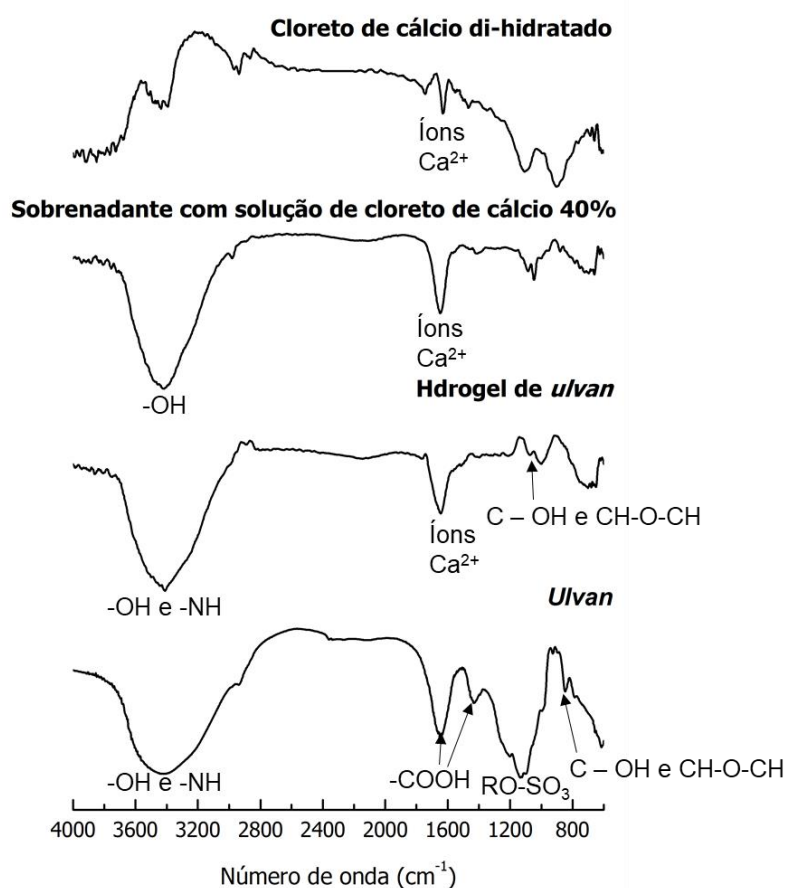
6.2.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF)

Os resultados obtidos por IVTF são apresentados na Figura 21. A análise dos resultados para o hidrogel de *ulvan* mostra que ele apresentou semelhanças com os resultados do *ulvan* liofilizado, por exemplo, a banda em 3410,15 cm⁻¹ que é atribuída a grupamentos -OH e -NH e os picos entre 1100-1000 cm⁻¹ correspondem aos estiramentos das ligações C – OH e CH-O-CH (éter glicosídico) (ALVES; SOUSA; REIS, 2013a).

Entretanto, em comparação com o *ulvan*, ocorreu um deslocamento do pico característico das ligações de éter glicosídico, uma vez que no espectro deste polissacarídeo, este pico se encontrava na faixa 900-800 cm⁻¹.

O estiramento em $1250\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$, correspondente ao grupo éter sulfato (RO-SO_3^-) e os estiramentos em $1647,21\text{ cm}^{-1}$ e $1429,25\text{ cm}^{-1}$ correspondentes aos grupamentos carboxílicos ($-\text{COOH}$), presentes no *ulvan*, não foram observados nos resultados para o hidrogel deste polissacarídeo. Isto indica que na reação de gelificação do *ulvan* com o cloreto de cálcio, os íons cálcio (Ca^{2+}) se ligaram aos grupamentos sulfato (RO-SO_3^-) e aos grupos carboxila ($-\text{COOH}$), presentes no *ulvan*, o que pode ter ocasionado o desaparecimento destes estiramentos.

Figura 21 - Resultados dos ensaios de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier para o hidrogel de *ulvan*, o sobrenadante com solução de cloreto de cálcio 40% e o cloreto de cálcio di-hidratado em comparação com o *ulvan*



Fonte: Elaboração própria.

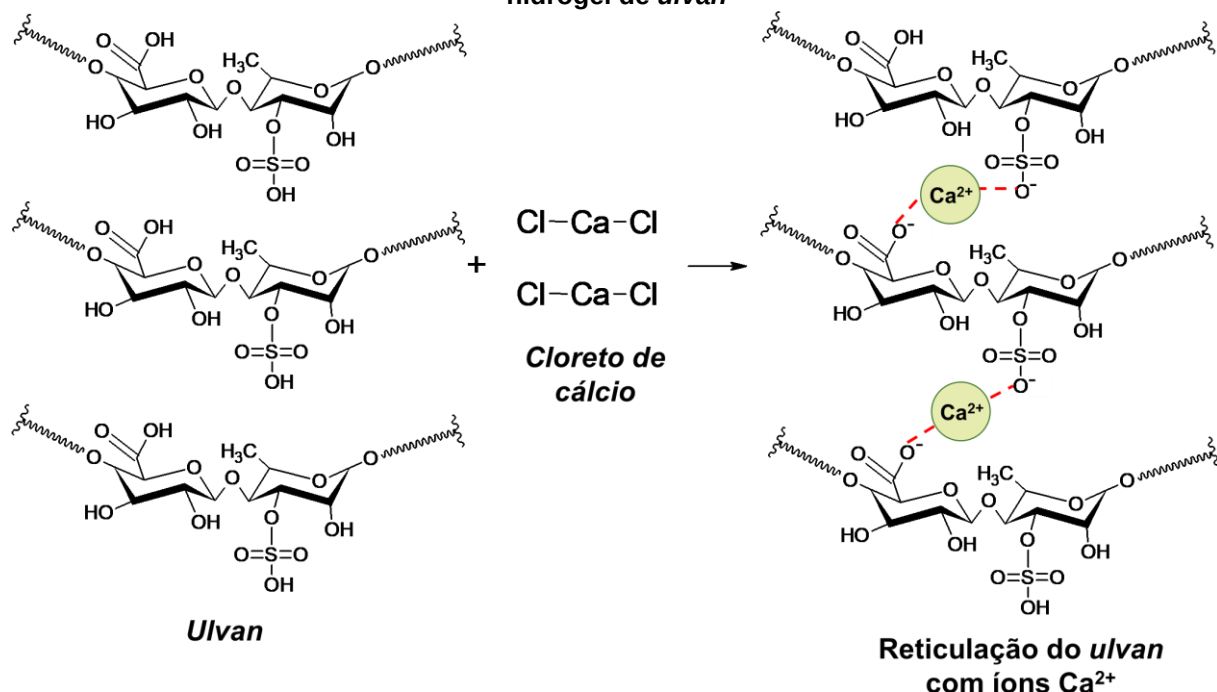
A ligação dos íons cálcio com os grupos sulfato e os grupos carboxílicos foi observada no sulfato de condroitina nos estudos de Han *et al.* (2008) e Fajardo *et al.* (2012). Estes autores definiram que estes íons apresentam a capacidade de se ligar a estes grupos a partir de ligações iônicas (FAJARDO *et al.*, 2012; HAN *et al.*, 2008). Este tipo de ligação é realizada com base na atração eletrostática de íons que

apresentam cargas opostas, por isto os íons cálcio (Ca^{2+}), que apresentam carga positiva, se ligam aos grupamentos RO-SO_3^- e $-\text{COO}^-$ que apresentam carga negativa.

Desta forma, com base na literatura é proposto que no caso do *ulvan*, a ligação iônica entre os íons cálcio e os grupamentos sulfato e grupamentos carboxílicos também aconteceu, visto que a estrutura química deste polissacarídeo sulfatado apresenta semelhança com a estrutura química do sulfato de condroitina.

O esquema do processo de reticulação do *ulvan* com íons cálcio para a obtenção do hidrogel de *ulvan* pode ser observado na Figura 22.

Figura 22 – Esquema do processo de reticulação do *ulvan* com íons cálcio para a obtenção do hidrogel de *ulvan*



Fonte: Elaboração própria.

Por outro lado, a interação dos íons cálcio com os grupamentos RO-SO_3^- e $-\text{COOH}$, ocasionou o aparecimento do estiramento característico do cálcio, na faixa de $1650\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$, no local onde deveria aparecer o estiramento característico da presença de $-\text{COOH}$.

O hidrogel de *ulvan* também apresentou semelhanças com o sobrenadante e o cloreto de cálcio sólido, por exemplo, o estiramento em $1643,35\text{ cm}^{-1}$, uma vez que nas três amostras analisadas por RTA este estiramento está presente na faixa de $1650\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ e pode estar relacionado com o cálcio presente nestas amostras.

O cloreto de cálcio apresentou estiramentos em $1745,58\text{ cm}^{-1}$, $1107,14\text{ cm}^{-1}$ e em $898,83\text{ cm}^{-1}$, e nas faixas $2970\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$, $3169\text{--}3050\text{ cm}^{-1}$, $3960\text{--}3390\text{ cm}^{-1}$. E o sobrenadante que apresentou estiramentos em $3421,72\text{ cm}^{-1}$, $2980,02\text{ cm}^{-1}$, $1411,89\text{ cm}^{-1}$, $1085,92\text{ cm}^{-1}$ e em $1047,35\text{ cm}^{-1}$ e nas faixas $1000\text{--}625\text{ cm}^{-1}$ e $3945\text{--}3720\text{ cm}^{-1}$.

Além disto, o espectrograma do hidrogel de *ulvan* foi comparado com os resultados de IVTF, encontrados na literatura, para o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina, uma vez que este material foi desenvolvido com o intuito de ser avaliado como possível substituto destes polímeros.

De acordo com os estudos de Amrutkar e Gattani (2009), o sulfato de condroitina apresenta uma banda em 3436 cm^{-1} atribuída aos grupamentos -OH e -NH, o estiramento em 2923 cm^{-1} corresponde ao grupo metil ou metileno (-C-H), o estiramento em 1039 cm^{-1} corresponde à ligação C-O e o pico em 1636 cm^{-1} corresponde às bandas de amida. As bandas localizadas em 1413 e 1380 cm^{-1} indicam a ausência do grupo carboxila livre e o pico em 1253 cm^{-1} corresponde às vibrações de alongamento da ligação S=O (RO-SO_3^-), que é o pico de absorção característico do sulfato de condroitina (AMRUTKAR; GATTANI, 2009).

Em comparação com o sulfato de condroitina, o hidrogel de *ulvan* apresentou o pico característico do grupamento -OH, entretanto não apresentou os picos característicos do grupo sulfato e grupamentos carboxílicos, uma vez que os íons cálcio se ligaram a estes dois tipos de grupamento, na reação de gelificação do *ulvan*. Além disto, o hidrogel de *ulvan* não apresentou um pico em 1636 cm^{-1} correspondente ao grupamento amida, uma vez que este grupamento não está presente na estrutura química do *ulvan*.

De acordo com os estudos de Yahya et al. (2016), o ácido hialurônico apresenta um pico em $1052,24\text{ cm}^{-1}$ que corresponde ao alongamento C-O-C, um pico em $1412,05\text{ cm}^{-1}$ que indica a combinação das ligações C-O e C=O, um pico em $1653,14\text{ cm}^{-1}$ que confirma a presença do grupamento amida, um pico em $2368,59\text{ cm}^{-1}$ que indica a presença do alongamento C-H e um pico em $3451,07\text{ cm}^{-1}$ que indica a presença do grupamento -OH (YAHYAEI et al., 2016).

Em comparação com o ácido hialurônico, o hidrogel de *ulvan* apresentou os picos característicos do grupamento -OH e da ligação CH-O-CH. Além disto, o hidrogel de *ulvan* não apresentou um pico em 1636 cm^{-1} correspondente ao grupamento amida.

Em relação aos resultados de IVTF, o hidrogel de *ulvan* apresentou mais diferenças com o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina do que o *ulvan* liofilizado, em decorrência do processo de reticulação. Neste processo, os íons cálcio se ligaram aos grupamentos (RO-SO_3^-) e $-\text{COOH}$, uma vez que os picos característicos destes grupamentos não foram observados no espectro de IVTF deste hidrogel. Desta forma, mais estudos precisam ser realizados para compreender de maneira mais aprofundada a ligação dos íons Ca^{2+} na molécula de *ulvan*.

6.2.6 Difração de raios X (DRX)

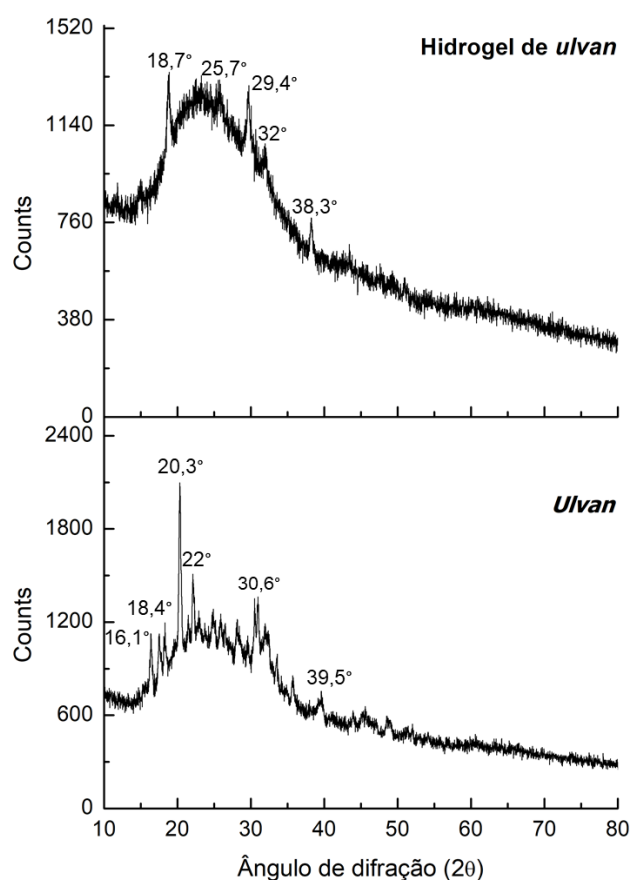
A difração de raios X foi realizada com o intuito de determinar o grau de cristalinidade do hidrogel de *ulvan* liofilizado com o intuito de avaliar à semelhança deste material com o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina, uma vez que este hidrogel foi desenvolvido com o intuito de ser avaliado como possível substituto destes polímeros.

Além disto, esta técnica foi realizada para avaliar a viabilidade da utilização deste material para a aplicação em cartilagens inflamadas, visto que a literatura científica apresenta diversos estudos sobre a utilização do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina para esta aplicação.

Os resultados para o hidrogel em comparação com o *ulvan* são apresentados na Figura 23. O difratograma do hidrogel mostra as principais reflexões cristalinas em $18,7^\circ$, $25,7^\circ$, $29,4^\circ$, 32° e $38,3^\circ$ e o difratograma do *ulvan* mostra as principais reflexões cristalinas em $16,1^\circ$, $18,4^\circ$, $20,3^\circ$, 22° , $30,6^\circ$ e $39,5^\circ$.

Os resultados obtidos para o hidrogel de *ulvan* foram diferentes dos resultados obtidos para o *ulvan*, de forma que o hidrogel apresentou uma cristalinidade maior do que este polissacarídeo sulfatado. Isto é explicado pelo fato de que a maioria dos picos característicos de cristalinidade presentes no difratograma do hidrogel, apresentou uma intensidade maior do que os picos presentes no difratograma do *ulvan* (GAO *et al.*, 2020; SANTOS; TAVARES, 2013). Desta forma, a alteração da cristalinidade do *ulvan* foi ocasionada pelo processo de reticulação deste polissacarídeo sulfatado com íons cálcio.

Figura 23 - Difratomogramas de raios X do hidrogel de *ulvan* e do *ulvan*



Fonte: Elaboração própria.

No difratograma do hidrogel de *ulvan*, foi observado que este material apresenta característica de uma substância semicristalina, uma vez que apresenta uma região amorfa e uma região de picos característicos de substâncias cristalinas (GAO *et al.*, 2020; SANTOS; TAVARES, 2013), entretanto, os resultados de CED e MEV indicaram que o hidrogel apresenta característica cristalina e não semicristalina.

Desta forma, foi concluído que a técnica de CED é mais confiável do que a técnica de DRX, para a avaliação da cristalinidade das amostras, uma vez que a obtenção do grau de cristalinidade a partir da difração de raios X está sujeita a mais erros de execução, em decorrência do fato de que esta técnica apresenta mais parâmetros a serem definidos, por exemplo, a linha de base e a área de difração cristalina (SILVA, 2018).

Enquanto, a definição da linha de base para o pico energético é o único parâmetro que precisa ser definido antes da realização da técnica de calorimetria exploratória diferencial (CED), o que ocasiona a redução da incidência de erros de execução em comparação com a técnica de DRX.

Além disto, o difratograma do hidrogel de *ulvan* foi comparado com os resultados de DRX, encontrados na literatura, para o sal sódico de ácido hialurônico (hialuronato de sódio) e o sulfato de condroitina, uma vez que não foram encontrados resultados de DRX para o ácido hialurônico isolado.

De acordo com os estudos de Fajardo *et al.* (2012), o sulfato de condroitina isolado apresentou uma reflexão cristalina em 23,69°. Esta reflexão cristalina é caracterizada pela presença de um pico amplo e com baixa intensidade, o que indica que a estrutura deste polissacarídeo apresenta baixa cristalinidade. Desta forma, o sulfato de condroitina possui estrutura semicristalina (FAJARDO *et al.*, 2012), conforme foi observado nos resultados de CED obtidos por Kaur e Kaur (2013).

De acordo com os estudos de Radhakumary, Nandkumar e Nair (2011), o sal sódico de ácido hialurônico (hialuronato de sódio) não apresentou reflexões cristalinas, desta forma, este material apresenta estrutura amorfa (RADHAKUMARY; NANDKUMAR; NAIR, 2011). Desta forma, o hialuronato de sódio apresentou menos cristalinidade do que o ácido hialurônico, que possui estrutura semicristalina, conforme foi observado nos resultados de CED obtidos por Ma *et al.* (2012).

O hidrogel de *ulvan* apresentou mais cristalinidade do que o sulfato de condroitina, o ácido hialurônico e o hialuronato de sódio, uma vez que apresenta estrutura cristalina. Desta forma, com base nestes resultados, foi observado que o processo de reticulação do *ulvan*, com íons Ca^{2+} , ocasionou o aumento da cristalinidade deste polissacarídeo, ao contrário do que acontece no processo de reticulação do ácido hialurônico. De acordo com os estudos de Zhang e Huang (2012), a reticulação deste polímero proporciona a diminuição de sua cristalinidade e a obtenção de um hidrogel com estrutura amorfa (ZHANG; HUANG, 2012).

Com o intuito de realizar a comparação do hidrogel de *ulvan* com o ácido hialurônico de uma forma mais aprofundada, a cristalinidade do material foi associada à eficiência da aplicação de materiais cristalinos e amorfos em cartilagens inflamadas, visto que a literatura científica apresenta diversos estudos sobre a utilização do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina para a recuperação deste tecido cartilaginoso.

Segundo os estudos de Zhang e Huang (2012), para que o tratamento de cartilagens inflamadas e desgastadas seja realizado de forma eficiente, a partir da aplicação de injeções intra-articulares com ácido hialurônico e fármacos, é ideal que os sistemas de liberação de fármacos anti-inflamatórios e os sistemas de liberação de ácido hialurônico, apresentem característica amorfa (ZHANG; HUANG, 2012).

Isto é explicado pelo fato de que as substâncias amorfas são insolúveis em água. Desta forma, a utilização de sistemas de liberação insolúveis em água, permite que o ácido hialurônico permaneça por mais tempo na cartilagem, permite a liberação sustentada dos fármacos anti-inflamatórios e proporciona a diminuição da frequência de aplicação das injeções intra-articulares necessárias para a recuperação completa das cartilagens (ZHANG; HUANG, 2012).

A administração do ácido hialurônico pela via intra-articular é responsável pela manutenção da homeostase e da integridade biomecânica destes tecidos cartilaginosos, além de proporcionar a diminuição da inflamação articular (PILLONI *et al.*, 2019; ZHANG; HUANG, 2012).

Além disto, a utilização de sistemas de liberação de fármacos, com característica cristalina, no tratamento da osteoartrite não é viável, uma vez que a cristalinidade presente nestes sistemas pode ocasionar o surgimento da artrite induzida por cristal, que já foi observada na administração intra-articular de glicocorticoides (ZHANG; HUANG, 2012).

Outra desvantagem da utilização de sistemas cristalinos, é o fato de que estes sistemas são solúveis em água, o que faz com que os glicocorticoides permaneçam na cartilagem por um tempo muito curto. Desta forma, a utilização de sistemas com estrutura cristalina proporciona o aumento da frequência de aplicação das injeções intra-articulares (ZHANG; HUANG, 2012).

Com base nos resultados encontrados na literatura, foi determinado que o hidrogel de *ulvan* obtido a partir da reticulação com íons Ca^{2+} não apresentou as características necessárias para ser utilizado no tratamento eficiente das cartilagens inflamadas e desgastadas, a partir da aplicação de injeções intra-articulares, uma vez que este hidrogel apresenta estrutura cristalina.

Desta forma, estudos precisam ser realizados para promover a alteração do grau de cristalinidade do hidrogel, a partir da adição de outros reticulantes, de forma que este material passe a apresentar uma estrutura amorfa, uma vez que materiais com este tipo de estrutura são mais adequados para o tratamento das cartilagens.

6.2.7 Determinação do diâmetro de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidade

Os valores obtidos para o diâmetro de partícula (DP), o potencial zeta (PZ) e o índice de polidispersidade (IPD) do hidrogel de *ulvan* foram, respectivamente, $227,66 \pm 6,13$ nm, $(-) 25,21 \pm 0,98$ mV e $0,325 \pm 0,018$.

A análise dos resultados de diâmetro de partícula e índice de polidispersidade mostra que as partículas presentes na dispersão do hidrogel de *ulvan* apresentaram organização estrutural nanométrica e índice de polidispersidade próximo de 0,3. O resultado obtido para o índice de polidispersidade mostra que o sistema apresentou polidispersidade média, uma vez que o valor obtido foi superior a 0,25, valor máximo para que os sistemas dispersos apresentem homogeneidade nos diâmetros de partículas (CHO *et al.*, 2013).

O resultado de potencial zeta mostra que as partículas apresentaram carga negativa, o que era esperado, uma vez que o *ulvan* é um polissacarídeo aniônico. Desta forma, em meio aquoso (água purificada, pH $7 \pm 0,1$) ocorreu a liberação dos hidrogênios ligados ao grupamento sulfato (RO-SO_3^-) e ao grupamento carboxila ($-\text{COOH}$), o que faz com que as partículas apresentem potencial de superfície negativo, apesar da interação iônica dos íons cálcio com estes grupamentos.

Para que um sistema seja termodinamicamente estável, o potencial zeta tem que apresentar valores relativamente elevados, de preferência, superiores a + 30 mV ou inferiores a -30 mV (PANDOCHI, 2009). Desta forma, em decorrência destes valores de PZ, o sistema apresenta o aumento das forças de repulsão entre as partículas, o que ocasiona a diminuição da tendência de agregação destas partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A partir disto, foi definido que a dispersão do hidrogel de *ulvan*, apresentou estabilidade, visto que o potencial zeta de $-25,21 \pm 0,98$ mV é próximo do valor de -30 mV, que é valor necessário para a formação de um sistema termodinamicamente estável.

A dispersão do hidrogel de *ulvan* apresentou diâmetro de partícula inferior e índice de polidispersidade superior à dispersão de *ulvan*. Além disto, a dispersão do hidrogel apresentou uma estabilidade maior do que a dispersão deste polissacarídeo sulfatado, visto que apresentou um potencial zeta mais próximo de -30 mV.

Os resultados da dispersão do hidrogel de *ulvan* foram comparados com os resultados de diâmetro de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidade, encontrados na literatura, para o sal sódico de ácido hialurônico (hialuronato de sódio), uma vez que não foram encontrados resultados para o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina em sua forma isolada.

De acordo com os estudos de Ekici *et al.* (2011), os valores obtidos para o diâmetro de partícula e o potencial zeta do sal sódico de ácido hialurônico (hialuronato de sódio) foram, respectivamente, ~500 nm e -30 mV. Estes autores não informaram o resultado de índice de polidispersidade (EKICI *et al.*, 2011). Em comparação com a dispersão do hidrogel de *ulvan*, a dispersão de hialuronato de sódio apresentou diâmetro de partícula maior e uma estabilidade maior, visto que o valor de potencial zeta de -30 mV, indica a formação de um sistema termodinamicamente estável.

O resultado de potencial zeta obtido por Ekici *et al.* (2011) mostra que o hialuronato de sódio, apresenta carga negativa assim como o hidrogel de *ulvan*, o que é explicado pela liberação do hidrogênio ligado ao grupamento -COOH, presente na estrutura deste material, em meio aquoso (solução de nitrato de potássio, 10 mM). Desta forma, apesar de apresentar estabilidades diferentes, tanto o hidrogel de *ulvan* quanto o hialuronato de sódio são materiais aniônicos.

As diferenças dos resultados de diâmetro de partícula e potencial zeta destes materiais podem estar relacionadas à alguns fatores, entre eles, a diferença na estrutura química do hidrogel de *ulvan* e do hialuronato de sódio, a utilização de solventes diferentes para a obtenção da dispersão analisada e a proporção desta dispersão, uma vez que quanto maior a proporção entre o material e o solvente, menor vai ser o diâmetro de partícula.

6.2.8 Viscosidade do hidrogel de *ulvan* nas temperaturas Tgel-sol e Tsol-gel

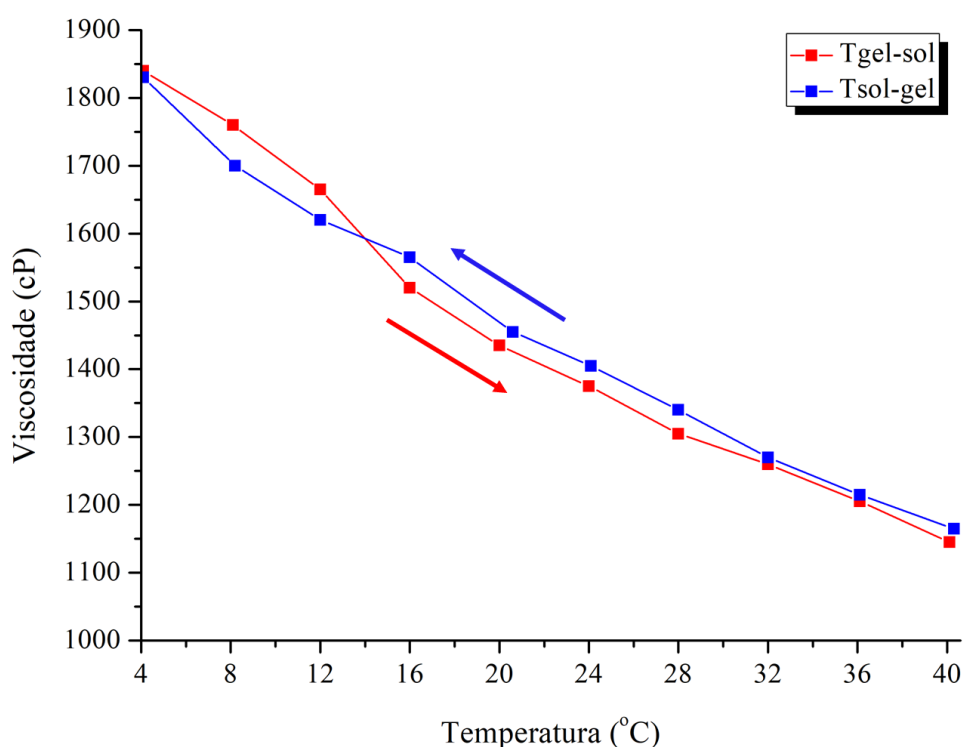
As propriedades termorresponsivas do hidrogel de *ulvan* foram avaliadas pela temperatura de transição gel-sol (Tgel-sol) e pela temperatura de transição sol – gel (Tsol-gel). Durante os testes, a medida de erro relativo (%torque) variou entre 22 e 37%, o que foi ideal, uma vez que %torque devia estar entre 10 e 100%.

As curvas obtidas para as duas transições avaliadas são apresentadas na Figura 24. A análise dos resultados mostra que durante o aquecimento realizado para a transição gel-sol, o hidrogel apresentou o maior valor de viscosidade na temperatura

de 4 °C (1840 cP) e o menor valor na temperatura de 40 °C (1145 cP). Durante o resfriamento realizado para a transição sol-gel, o hidrogel apresentou o maior valor de viscosidade na temperatura de 4 °C (1830 cP) e o menor valor na temperatura de 40 °C (1165 cP).

Os valores obtidos para a viscosidade no processo de resfriamento da amostra foram maiores do que os valores obtidos no processo de aquecimento na faixa de temperatura de 14 - 40 °C. Entretanto, na faixa de temperatura de 4 – 14 °C, os valores obtidos para a viscosidade da amostra no processo de resfriamento foram menores do que os valores obtidos no aquecimento do hidrogel. Na temperatura de 14 °C ocorreu a intersecção das duas curvas (Figura 24) e a viscosidade do hidrogel neste ponto foi igual a 1594 cP. Desta forma, a partir desta temperatura o hidrogel não conseguiu retornar à sua viscosidade inicial.

Figura 24 - Estudo da viscosidade do hidrogel de *ulvan* em função da variação da temperatura



Nota: A seta vermelha indica o aquecimento do hidrogel de *ulvan* realizado para a transição gel-sol (Tgel-sol) e a seta azul indica o resfriamento do hidrogel de *ulvan* para a determinação da transição sol-gel (Tsol-gel).

Fonte: Elaboração própria.

As curvas obtidas para o aquecimento e para o resfriamento do hidrogel não sofreram sobreposição, uma vez que durante a transição sol-gel, o hidrogel não conseguiu recuperar a viscosidade obtida na transição gel-sol, com exceção do ponto

de intersecção entre as duas curvas no qual estas apresentaram a mesma viscosidade para a temperatura de 14 °C. O fenômeno caracterizado pela ausência da sobreposição das curvas é denominado histerese (NORONHA, 2016).

Os resultados obtidos para este teste corroboram com os resultados do método de inversão de tubo que foi realizado para a avaliação da viscosidade aparente do hidrogel de *ulvan*, uma vez que nos dois testes, a viscosidade do hidrogel diminuiu com o aumento da temperatura.

O hidrogel de *ulvan* apresentou propriedades termorresponsivas diferentes das propriedades dos hidrogéis termorresponsivos constituídos de ácido hialurônico e sulfato de condroitina desenvolvidos por Choh, Cross e Wang (2011) e Gao *et al.* (2018), uma vez que estes hidrogéis apresentaram o aumento da viscosidade em decorrência do aumento da temperatura, ao contrário do que foi observado no hidrogel de *ulvan* (CHOH; CROSS; WANG, 2011; GAO *et al.*, 2018).

As características termorresponsivas dos hidrogéis constituídos de ácido hialurônico e sulfato de condroitina são importantes para a utilização destes polímeros em diversas aplicações, entre elas, o tratamento de cartilagens articulares inflamadas e desgastadas, a partir da utilização de injeções intra-articulares.

Para a aplicação destes hidrogéis em cartilagens com injeção intra-articular é necessário que estes materiais apresentem viscosidade baixa na temperatura ambiente (25 °C), e que na temperatura do local de aplicação (37 °C), ocorra o aumento de sua viscosidade, de modo que os hidrogéis tenham a capacidade de permanecer nas cartilagens para a realização de um tratamento eficiente, com o menor número possível de aplicações do hidrogel (CHOH; CROSS; WANG, 2011; GAO *et al.*, 2018).

Desta forma, visto que o hidrogel de *ulvan* foi desenvolvido com o intuito de ser avaliado como possível substituto do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina, as propriedades termorresponsivas deste hidrogel precisam ser alteradas, de modo que o aumento da temperatura ocasione o aumento de sua viscosidade, conforme foi observado nos hidrogéis desenvolvidos por Choh, Cross e Wang (2011) e Gao *et al.* (2018).

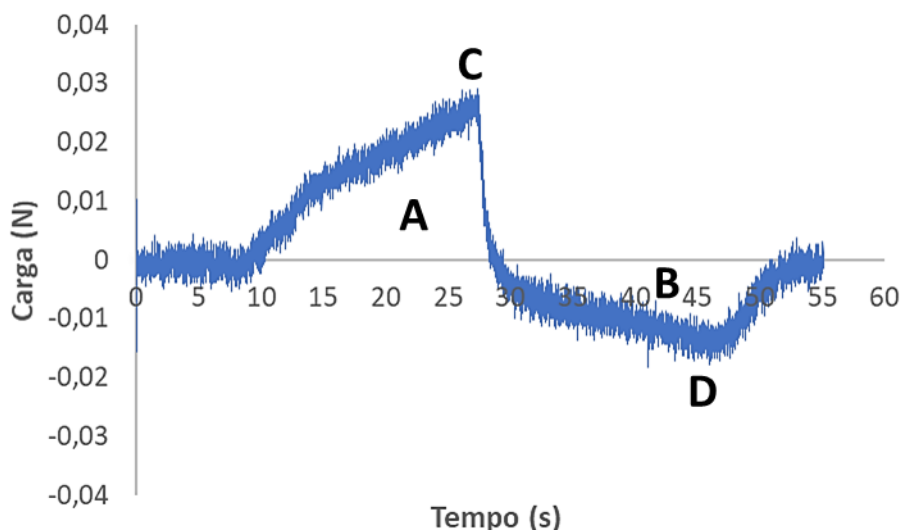
Estas alterações precisam ser realizadas, uma vez que o aumento da temperatura ocasiona o aumento da fluidez do hidrogel de *ulvan*, o que é um empecilho para a sua utilização como substituto destes polímeros em diversas

aplicações, entre elas, o tratamento de cartilagens articulares inflamadas e desgastadas, a partir da via intra-articular.

6.2.9 Propriedades mecânicas

A curva obtida na análise das propriedades mecânicas do hidrogel de *ulvan* é apresentada na Figura 25. Este ensaio foi realizado em temperatura ambiente (25 °C), uma vez que na temperatura de 37 °C, utilizada na realização do ensaio de mucoadesão, o aumento da fluidez do hidrogel impossibilitou a realização deste ensaio.

Figura 25 - Resultados obtidos para as propriedades mecânicas (A) compressibilidade, (B) adesividade, (C) dureza e (D) coesividade do hidrogel de *ulvan*



Fonte: Elaboração própria.

Como descrito por Alves *et al.* (2018a), na Figura 25, a área positiva (A) corresponde à compressibilidade, que está relacionada com o trabalho necessário para ocasionar a deformação do produto. Esta propriedade mecânica precisa estar relacionada à dureza do hidrogel de *ulvan*. O pico positivo (C) corresponde à dureza, que representa a força necessária para atingir uma certa deformação (ALVES *et al.*, 2018a).

A compressibilidade e a dureza do hidrogel de *ulvan* estão relacionadas à força necessária para remover o hidrogel de sua embalagem e à administração do hidrogel no local de aplicação. Além disto, estas propriedades mecânicas podem estar

relacionadas à capacidade que o hidrogel apresenta em permanecer no local em que a aplicação foi realizada (FERREIRA *et al.*, 2017).

A área negativa (B) representa à adesividade. Esta propriedade mecânica, relacionada a propriedade mucoadesiva, corresponde ao trabalho necessário para separar o probe da amostra enquanto ocorre a quebra de suas forças coesivas. O pico negativo (D) corresponde à coesividade, que representa o efeito da tensão de cisalhamento sobre as propriedades características da estrutura do hidrogel (ALVES *et al.*, 2018a).

Os resultados numéricos obtidos para as propriedades mecânicas (dureza, compressibilidade, adesividade e coesividade) são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6– Resultados para os ensaios das propriedades mecânicas: dureza, compressibilidade, adesividade e coesividade do hidrogel de *ulvan* (média $\pm$ Desvio Padrão) (n=3)

Dureza (N)	Compressibilidade (N.s ⁻¹)	Adesividade (N.s ⁻¹)	Coesividade (N)
0,032 $\pm$ 0,003	0,293 $\pm$ 0,056	0,162 $\pm$ 0,018	0,023 $\pm$ 0,000

Fonte: Elaboração própria.

Em decorrência do fato de o hidrogel de *ulvan* ter sido desenvolvido com o intuito de ser avaliado como possível substituto do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina, é ideal que este material apresente semelhanças viscosimétricas e fisiomecânicas com os hidrogéis destes polímeros. Os hidrogéis de ácido hialurônico e sulfato de condroitina são aplicados na temperatura ambiente (25 °C) e apresentam o aumento da viscosidade no local de aplicação (37 °C) (CHOH; CROSS; WANG, 2011; GAO *et al.*, 2018).

Desta forma, o aumento da temperatura dos hidrogéis destes polímeros e o consequente aumento de sua viscosidade, em decorrência de suas características termorresponsivas, estão diretamente relacionados às propriedades mecânicas destes materiais. Isto é explicado pelo fato de que quanto maior a viscosidade do hidrogel, maior será a resistência que o probe encontra durante a realização dos testes para a avaliação destas propriedades e, conseqüentemente, maiores serão os valores encontrados para a dureza, adesividade, compressibilidade e coesividade (FERREIRA *et al.*, 2017).

Um exemplo da necessidade do aumento da viscosidade em decorrência do aumento da temperatura é aplicação destes materiais a partir de injeções intra-articulares em cartilagens inflamadas e desgastadas.

Nesta aplicação biomédica, os hidrogéis precisam apresentar valores baixos para as propriedades mecânicas, na temperatura ambiente (25 °C), para facilitar a aplicação destes materiais a partir da utilização de injeções intra-articulares, e precisam apresentar o aumento dos valores destas propriedades quando entram em contato com as cartilagens (37 °C), com o intuito de apresentar a capacidade de permanecer no local de aplicação durante o maior tempo possível (CHOH; CROSS; WANG, 2011; FERREIRA *et al.*, 2017; GAO *et al.*, 2018).

Em decorrência do fato de o hidrogel de *ulvan* apresentar a diminuição da viscosidade em decorrência do aumento da temperatura, não foi possível realizar o teste para a avaliação das propriedades mecânicas do hidrogel na temperatura de 37 °C, para a realização da comparação com a temperatura de 25 °C, uma vez que o probe não encontrou resistência no hidrogel.

Estas características do hidrogel de *ulvan* impossibilitam a sua utilização como substituto do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina na aplicação em cartilagens inflamadas e desgastadas, por exemplo, uma vez que esta aplicação exige o aumento dos valores de dureza, adesividade, compressibilidade e coesividade em decorrência do aumento da temperatura, o que não foi observado no hidrogel de *ulvan*, que apresentou valores baixos para estas propriedades na temperatura de 25 °C.

Desta forma, para que o hidrogel de *ulvan* seja utilizado como substituto destes polímeros em aplicações biomédicas, é necessário que as propriedades termorresponsivas deste hidrogel sejam alteradas, de forma que o aumento da viscosidade e da resistência mecânica deste material seja ocasionado pelo aumento da temperatura. Com isto, é esperado que com a alteração destas propriedades, o aumento da temperatura ocasione o aumento dos valores das propriedades mecânicas (dureza, adesividade, compressibilidade e coesividade) do hidrogel de *ulvan*.

Com base nisto, é esperado que após a alteração das propriedades termorresponsivas, o hidrogel de *ulvan* apresente a capacidade de ser aplicado de forma facilitada em temperatura ambiente (25 °C) e apresente a capacidade de permanecer no local de aplicação (37 °C) durante o maior tempo possível para

proporcionar um tratamento mais eficiente com o menor número possível de aplicações do hidrogel.

6.2.10 Propriedade mucoadesiva

O resultado do teste de mucoadesão mostrou que a força máxima necessária para separar o disco de mucina do hidrogel de *ulvan* foi igual a $0,305 \pm 0,067$ N. Este teste foi importante para avaliar o comportamento do hidrogel em contato com o disco de mucina, uma vez que este ensaio tem a função de simular a interação do hidrogel com a camada de muco que é responsável pelo recobrimento do tecido mucosal (EDSMAN; HÄGERSTRÖM, 2005).

De acordo com Bogataj *et al.* (2003), o processo de mucoadesão está diretamente relacionado aos valores de potencial zeta da camada de muco presente nos tecidos mucosais e dos polímeros utilizados neste processo. Visto que o homogenato da mucosa, obtido por estes autores, apresentou característica aniônica, com potencial zeta de $-20,1 \pm 0,9$ mV, Bogataj *et al.* (2003), observaram que a força necessária para separar a mucosa dos polímeros era menor quando o polímero utilizado apresentava potencial zeta negativo. Isto é explicado pelo fato de que quando os dois compostos apresentavam cargas negativas, ocorria a repulsão destas cargas iônicas, o que facilitava o término da adesão entre a camada mucosa e o polímero (BOGATAJ *et al.*, 2003).

Desta forma, visto que a mucina e o hidrogel de *ulvan* são compostos aniônicos, ou seja, apresentam valores de potencial zeta negativos, o mecanismo de mucoadesão entre estes materiais não está relacionado à interação eletrostática, que ocorre quando a mucoadesão é realizada em decorrência da atração de materiais com cargas iônicas opostas. Portanto, é proposto que o mecanismo de mucoadesão ocorreu, preferencialmente, em decorrência da interpenetração e o entrelaçamento das cadeias do polímero e do substrato mucoso (ALVES *et al.*, 2018a).

Visto que o hidrogel de *ulvan* foi desenvolvido com o intuito de ser avaliado como possível substituto do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina, o resultado do teste de mucoadesão do hidrogel foi comparado com os resultados encontrados na literatura para o sal sódico de ácido hialurônico e o sulfato de condroitina, uma vez que não foram encontrados resultados para o ácido hialurônico isolado.

O valor obtido para o teste de mucoadesão do hidrogel de *ulvan* foi superior aos valores encontrados na literatura para o teste de mucoadesão *ex vivo* do sal sódico de ácido hialurônico, que foi realizado com a utilização de mucosas bucal e nasal de porco (LAFFLEUR, 2018), e aos valores encontrados na literatura para o teste de mucoadesão *ex vivo* de um hidrogel constituído de sulfato de condroitina e Carbopol, que foi realizado com a utilização de mucosa gástrica de coelhos (ALI *et al.*, 2019).

De acordo com os estudos de Laffleur (2018), a força máxima necessária para separar as mucosas bucal e nasal do sal sódico de ácido hialurônico estava na faixa de 0,1 – 0,2 N (LAFFLEUR, 2018) e de acordo com os estudos de Ali *et al.* (2019), a força máxima necessária para separar a mucosa gástrica do hidrogel de sulfato de condroitina estava na faixa de 0,15 – 0,3 N (ALI *et al.*, 2019).

Entretanto, apesar de o hidrogel de *ulvan* apresentar valores mais altos para a propriedade mucoadesiva do que os valores encontrados na literatura, esta propriedade está relacionada às propriedades viscosimétricas e fisiomecânicas do hidrogel que, de acordo com os resultados dos testes realizados para a determinação destas propriedades, precisam ser aperfeiçoadas.

O aperfeiçoamento destas propriedades precisa ser realizado, uma vez que para que o hidrogel de *ulvan* apresente a capacidade de permanecer o maior tempo possível aderido ao tecido mucosal e a outros tecidos, para a realização de um tratamento eficiente de inflamações e lesões, é necessário que o hidrogel apresente o aumento da viscosidade na temperatura do local de aplicação (37 °C), o que não foi observado nos testes de viscosidade deste material. Além disto, este aperfeiçoamento precisa ser realizado para que o hidrogel de *ulvan* possa ser utilizado em aplicações biomédicas como substituto do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina.

Desta forma, o esperado é que com o aumento da viscosidade e com o aumento da temperatura, o material apresente o aumento da capacidade de mucoadesão. Entretanto, é necessário realizar mais testes para a compreensão mais aprofundada da propriedade mucoadesiva do hidrogel de *ulvan*.

7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados mostrou que a metodologia utilizada foi eficiente para a realização da extração de *ulvan*, com alto grau de pureza, e para obtenção de um hidrogel de *ulvan*, a partir da reticulação do *ulvan* com íons cálcio (Ca^{2+}).

A técnica de extração com homogeneização em Ultra-Turrax e aquecimento por micro-ondas foi eficiente na obtenção de um rendimento de 25,54% em polissacarídeos. A caracterização físico-química por IVTF comprovou que o material liofilizado é constituído por *ulvan*, uma vez que este material apresenta os picos característicos deste polissacarídeo sulfatado. Além disto, foi observado que o *ulvan* apresentou grupamentos químicos em comum com o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina, o que era esperado em decorrência da semelhança da estrutura química do *ulvan* com a estrutura química destes polímeros.

A caracterização por EDL e ELAF mostrou que a dispersão aquosa deste polissacarídeo era constituída de partículas nanométricas e confirmou a característica aniônica do *ulvan*. A técnica de microtomografia computadorizada foi eficiente para demonstrar a capacidade de compactação do *ulvan*. A análise por FRX foi eficiente em indicar os principais elementos químicos presentes na alga *Ulva lactuca* e no *ulvan*. Além disto, a caracterização por CED e DRX comprovou a estrutura semicristalina deste polissacarídeo sulfatado aniônico.

O hidrogel de *ulvan* obtido apresentou característica termorresponsiva, com a diminuição da viscosidade em decorrência do aumento da temperatura. A caracterização físico-química por IVTF indicou que na reação do *ulvan* com o cloreto de cálcio, os íons cálcio (Ca^{2+}) se ligaram aos grupamentos sulfato (RO-SO_3^-) e aos grupamentos carboxílicos ($-\text{COOH}$) presentes no *ulvan*. A caracterização por EDL e ELAF mostrou que a dispersão aquosa deste hidrogel era constituída de partículas nanométricas e que o hidrogel apresentou característica aniônica, apesar da reação com os íons cálcio.

A caracterização por DSC e MEV indicou que o hidrogel de *ulvan* apresentou estrutura cristalina, o que não é indicado para a sua utilização em aplicações biomédicas, como substituto do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina, por exemplo, a aplicação em cartilagens articulares inflamadas e desgastadas. Desta forma, estudos precisam ser realizados para promover a alteração do grau de cristalinidade do hidrogel, a partir da adição de outros reticulantes, de forma que este

material passe a apresentar uma estrutura amorfa, uma vez que materiais com este tipo de estrutura são mais adequados para o tratamento das cartilagens articulares.

O hidrogel de *ulvan* não apresentou propriedades mecânicas adequadas para ser utilizado como substituto do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina em aplicações biomédicas, devido ao fato de apresentar valores baixos para estas propriedades na temperatura ambiente (25 °C), na qual a viscosidade do hidrogel era baixa, e devido à impossibilidade de realizar os testes para a determinação destas propriedades na temperatura do local de aplicação (37 °C).

O teste de mucoadesão do hidrogel de *ulvan* apresentou um valor superior aos valores encontrados na literatura para o sal sódico de ácido hialurônico e o sulfato de condroitina, entretanto, é necessário realizar um estudo mais aprofundado da propriedade mucoadesiva deste hidrogel, para entender se esta propriedade sofre influência do aumento da temperatura e do aumento da viscosidade do hidrogel.

Para que o hidrogel de *ulvan* seja utilizado como substituto do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina em aplicações biomédicas, é necessário que as propriedades termorresponsivas deste material sejam alteradas, de forma que o aumento da viscosidade e da resistência mecânica deste material seja ocasionado pelo aumento da temperatura. Desta forma, é esperado que com a alteração destas propriedades, o aumento da temperatura ocasione o aumento dos valores das propriedades mecânicas (dureza, adesividade, compressibilidade e coesividade) do hidrogel de *ulvan*.

Com base nisto, o hidrogel de *ulvan*, que foi desenvolvido com o intuito de avaliar a capacidade de utilizar o *ulvan* para biomimetizar o efeito do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina, não apresentou propriedades físicas, viscosimétricas e fisiomecânicas adequadas para a sua utilização como substituto destes polímeros. Desta forma, para que este material possa ser utilizado em aplicações biomédicas, como a aplicação em cartilagens articulares inflamadas e desgastadas, estas propriedades precisam ser aperfeiçoadas.

8 REFERÊNCIAS

- ABIRAMI, R. G.; KOWSALYA, S. Nutrient and nutraceutical potentials of seaweed biomass *Ulva lactuca* and *Kappaphycus alvarezii* Nutrient and Nutraceutical Potentials of Seaweed Biomass *Ulva lactuca* and *Kappaphycus alvarezii*. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 109–115, 2011.
- ADRIEN, A. *et al.* Pilot production of ulvans from *Ulva sp.* and their effects on hyaluronan and collagen production in cultured dermal fibroblasts. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1306–1314, 2017.
- AGUSTIN, T. I.; WAHYU, S.; YATMASARI, E. Study on the bioactive compounds of shark (*Prionace glauca*) cartilage and its inflammatory activity. **International Journal of PharmTech Research**, v. 9, n. 1, p. 171–178, 2016.
- ALBORZI, S.; LIM, L. T.; KAKUDA, Y. Encapsulation of folic acid and its stability in sodium alginate-pectin-poly(ethylene oxide) electrospun fibres. **Journal of Microencapsulation**, v. 30, n. 1, p. 64–71, 2013.
- ALI, A. *et al.* Preparation and in vitro evaluation of Chondroitin sulfate and carbopol based mucoadhesive controlled release polymeric composites of Loxoprofen using factorial design. **European Polymer Journal**, v. 121, p. 109312, 2019.
- ALVES, A. *et al.* Extraction and physico-chemical characterization of a versatile biodegradable polysaccharide obtained from green algae. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 15, p. 2194–2200, 2010.
- ALVES, A. *et al.* Processing ulvan into 2D structures: Cross-linked ulvan membranes as new biomaterials for drug delivery applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, n. 1–2, p. 76–81, 2012.
- ALVES, A.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. In vitro cytotoxicity assessment of ulvan, a polysaccharide extracted from green algae. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1143–1148, 2013a.
- ALVES, A.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. Processing of degradable ulvan 3D porous structures for biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 101, n. 4, p. 998–1006, 2013b.
- ALVES, T. *et al.* Formulation and evaluation of thermoresponsive polymeric blend as a vaginal. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 86, n. 3, p. 536–552, 2018a.
- ALVES, T. *et al.* Dense Lamellar Scaffold as Biomimetic Materials for Reverse Engineering of Myocardial Tissue: Preparation, Characterization and Physiomechanical Properties. **Journal of Material Science e Engineering**, v. 07, n. 05, p. 494, 2018b.
- ALVES, T. *et al.* Dense lamellar scaffold, biomimetically inspired, for reverse cardiac

remodeling: Effect of proanthocyanidins and glutaraldehyde. **Journal of Dispersion Science and Technology**, p. 1–14, 2019.

AMRUTKAR, J. R.; GATTANI, S. G. Chitosan-chondroitin sulfate based matrix tablets for colon specific delivery of indomethacin. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 2, p. 670–677, 2009.

AYA, K. L.; STERN, R. Hyaluronan in wound healing: Rediscovering a major player. **Wound Repair and Regeneration**, v. 22, n. 5, p. 579–593, 2014.

BAI, X. *et al.* Dual crosslinked chondroitin sulfate injectable hydrogel formed via continuous Diels-Alder (DA) click chemistry for bone repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 166, p. 123–130, 2017.

BARROS, A. A. A. *et al.* Carboxymethylation of ulvan and chitosan and their use as polymeric components of bone cements. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 11, p. 9086–9097, 2013.

BEZERRA-SILVA, G. C. D. *et al.* Efeito de extratos orgânicos de Meliaceae sobre Bemisia tabaci (Gennadius) biótipo B em tomateiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 477–485, 2010.

BHATTARAI, N. *et al.* Alginate-based nanofibrous scaffolds: Structural, mechanical, and biological properties. **Advanced Materials**, v. 18, n. 11, p. 1463–1467, 2006.

BIRAJDAR, R. P. *et al.* Synthesis and characterization of electrically responsive poly(acrylamide)-grafted-chondroitin sulfate hydrogel for transdermal drug delivery application. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 69, n. 3, p. 148–157, 2020.

BOGATAJ, M. *et al.* The correlation between zeta potential and mucoadhesion strength on pig vesical mucosa. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 5, p. 743–746, 2003.

BRADING, J. W. E.; GEORG-PLANT, M. M. T.; HARDY, D. M. The polysaccharide from the alga *Ulva lactuca*. Purification, hydrolysis, and methylation of the polysaccharide. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 319–324, 1954.

BRASIL. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. **Agência de Vigilância Sanitária**, v. 1, 2004.

BRAYDEN, D. J.; JEPSON, M. A.; BAIRD, A. W. Keynote review: intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 17, p. 1145–1157, 2005.

BULGARIU, L.; BULGARIU, D. Enhancing Biosorption Characteristics of Marine Green Algae (*Ulva lactuca*) for Heavy Metals Removal by Alkaline Treatment. **Journal of Bioprocessing e Biotechniques**, v. 04, n. 1, p. 1, 2014.

CHADWICK, S.; KRIEGEL, C.; AMIJI, M. Delivery strategies to enhance mucosal

vaccination. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 9, n. 4, p. 427–440, 2009.

CHIELLINI, F.; MORELLI, A. Ulvan: A Versatile Platform of Biomaterials from Renewable Resources. **Biomaterials — Physics and Chemistry**, p. 75–98, 2011.

CHO, E. J. *et al.* Nanoparticle characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 2093–2110, 2013.

CHOH, S. Y.; CROSS, D.; WANG, C. Facile synthesis and characterization of disulfide-cross-linked hyaluronic acid hydrogels for protein delivery and cell encapsulation. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 4, p. 1126–1136, 2011.

CÓRDOVA, H. *et al.* Successful outcomes of a new combined solution of hyaluronic acid, chondroitin sulfate and poloxamer 407 for submucosal injection: animal survival study. **Endoscopy International Open**, v. 07, n. 04, p. E576–E582, 2019.

COSTA, C. *et al.* Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 537–546, 2012.

CUNHA, L.; GREHA, A. Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications. **Marine Drugs**, v. 14, n. 3, p. 42, 2016.

DEPOSITPHOTOS. *Ulva lactuca*. Disponível em: <https://br.depositphotos.com/stock-photos/ulva-lactuca.html>. Acesso em: 25 nov. 2019.

DOROSZKO, M.; SEWERYN, A. Finite element modeling of anisotropic deformation behavior of the porous materials based on microtomographic images. **AIP Conference Proceedings**, v. 1780, n. 1, p. 060001, 2016.

DU SOUICH, P. *et al.* Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of chondroitin sulphate. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 8a, p. 1451–1463, 2009.

DURU, C. E. Mineral and phytochemical evaluation of Zea mays husk. **Scientific African**, v. 7, p. e00224, 2020.

EDSMAN, K.; HÄGERSTRÖM, H. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 1, p. 3–22, 2005.

EKICI, S. *et al.* Hyaluronic acid hydrogel particles with tunable charges as potential drug delivery devices. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 4, p. 1306–1313, 2011.

FAJARDO, A. R. *et al.* Hydrogel based on an alginate-Ca²⁺/chondroitin sulfate matrix as a potential colon-specific drug delivery system. **RSC Advances**, v. 2, n. 29, p. 11095–11103, 2012.

FARIAS, D. R. *et al.* Fine-tuning transmission electron microscopy methods to evaluate the cellular architecture of Ulvacean seaweeds (Chlorophyta). **Micron**, v.

96, p. 48–56, 2017.

FASCIANO, A. C. *et al.* Induced differentiation of m cell-like cells in human stem cell-derived ileal enteroid monolayers. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 149, p. e59894, 2019.

FENG, C. *et al.* 3D Printing of Lotus Root-Like Biomimetic Materials for Cell Delivery and Tissue Regeneration. **Advanced Science**, v. 4, n. 12, p. 1700401, 2017.

FERREIRA, S. B. D. S. *et al.* Linear correlation between rheological, mechanical and mucoadhesive properties of polycarbophil polymer blends for biomedical applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 68, p. 265–275, 2017.

FERREIRA, V. R. A. *et al.* Metal cation sorption ability of immobilized and reticulated chondroitin sulfate or fucoidan through a sol-gel crosslinking scheme. **Materials Today Communications**, v. 8, p. 172–182, 2016.

GAJARIA, T. K. *et al.* Integration of protein extraction with a stream of byproducts from marine macroalgae: a model forms the basis for marine bioeconomy. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 867–873, 2017.

GAO, X. *et al.* A novel polysaccharide isolated from *Ulva Pertusa*: Structure and physicochemical property. **Carbohydrate Polymers**, v. 233, p. 115849, 2020.

GAO, Y. *et al.* Injectable and self-crosslinkable hydrogels based on collagen type II and activated chondroitin sulfate for cell delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 2014–2020, 2018.

GESKOVSKI, N.; SAZDOVSKA, S. D.; GORACINOVA, K. Macroalgal Polysaccharides in Biomimetic Nanodelivery Systems. **Current pharmaceutical design**, v. 25, n. 11, p. 1265–1289, 2019.

GONZÁLEZ-BALLESTEROS, N. *et al.* Macroalgae to nanoparticles: Study of *Ulva lactuca* L. role in biosynthesis of gold and silver nanoparticles and of their cytotoxicity on colon cancer cell lines. **Materials Science and Engineering: C**, v. 97, p. 498–509, 2019.

GUERETTE, P. A. *et al.* Accelerating the design of biomimetic materials by integrating RNA-seq with proteomics and materials science. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 10, p. 908–915, 2013.

HAN, L. *et al.* Cartilage aggrecan can undergo self-adhesion. **Biophysical Journal**, v. 95, n. 10, p. 4862–4870, 2008.

HUSSEIN, U. K. *et al.* Chemoprevention of Diethylnitrosamine-Initiated and Phenobarbital-Promoted Hepatocarcinogenesis in Rats by Sulfated Polysaccharides and Aqueous Extract of *Ulva lactuca*. **Integrative Cancer Therapies**, v. 14, n. 6, p. 525–545, 2015.

JANG, M. H. *et al.* Intestinal villous M cells: An antigen entry site in the mucosal epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 16, p. 6110–6115, 2004.

JAULNEAU, V. *et al.* Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid signaling pathway. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

JOHN, D. M.; RINDI, F. Filamentous (Nonconjugating) and Plantlike Green Algae. **Freshwater Algae of North America**, v. Academic P, p. 375–427, 2015.

KANNO, K. *et al.* Biocompatible Hydrogel from a Green Tide-Forming Chlorophyta. **Journal of Sustainable Development**, v. 5, n. 4, p. 38–45, 2012.

KAUR, K.; KAUR, G. Formulation and evaluation of chitosan-chondroitin sulphate based nasal inserts for zolmitriptan. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

KIM, J. *et al.* Effects of molecular weight of hyaluronic acid on its viscosity and enzymatic activities of lysozyme and peroxidase. **Archives of Oral Biology**, v. 89, p. 55–64, 2018.

KOIVUSALO, L. *et al.* Tissue adhesive hyaluronic acid hydrogels for sutureless stem cell delivery and regeneration of corneal epithelium and stroma. **Biomaterials**, v. 225, p. 119516, 2019.

LAFFLEUR, F. Comparative mucoadhesive study of hyaluronic acid-based conjugates on different mucosae. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 14, p. 46071, 2018.

LAHAYE, M.; AXELOS, M. A. V. Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva spp.*). **Carbohydrate Polymers**, v. 22, n. 4, p. 261–265, 1993.

LE, B. *et al.* Optimization of microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Ulva pertusa* and evaluation of their antioxidant activity. **Antioxidants**, v. 8, n. 5, p. 129, 2019.

LI, J. *et al.* Improving surface and mechanical properties of alginate films by using ethanol as a co-solvent during external gelation. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 208–216, 2015.

LU, K. Y. *et al.* A novel injectable in situ forming gel based on carboxymethyl hexanoyl chitosan/hyaluronic acid polymer blending for sustained release of berberine. **Carbohydrate Polymers**, v. 206, p. 664–673, 2019.

MA, G. *et al.* Hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte complexes nanofibers prepared by electrospinning. **Materials Letters**, v. 74, p. 78–80, 2012.

MAHARJAN, S. *et al.* Systemic administration of RANKL overcomes the bottleneck of oral vaccine delivery through microfold cells in ileum. **Biomaterials**, v. 84, p. 286–

300, 2016.

MAO, W. *et al.* Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. **Journal of Applied phycology**, v. 18, n. 1, p. 9–14, 2006.

MASSIRONI, A. *et al.* Ulvan as novel reducing and stabilizing agent from renewable algal biomass: Application to green synthesis of silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 203, p. 310–321, 2019.

MHATRE, A. *et al.* Effect of multiple product extractions on bio-methane potential of marine macrophytic green alga *Ulva lactuca*. **Renewable Energy**, v. 132, p. 742–751, 2019.

MORELLI, A. *et al.* Design, preparation and characterization of ulvan based thermosensitive hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 1108–1117, 2016a.

MORELLI, A. *et al.* Enzymatically Crosslinked Ulvan Hydrogels as Injectable Systems for Cell Delivery. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 217, n. 4, p. 581–590, 2016b.

MORELLI, A.; CHIELLINI, F. Ulvan as a new type of biomaterial from renewable resources: Functionalization and hydrogel preparation. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 211, n. 7, p. 821–832, 2010.

NGUYEN, M. A.; CAMCI-UNAL, G. Unconventional Tissue Engineering Materials in Disguise. **Trends in Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 178–190, 2020.

NORONHA, E. V. N. DE. Avaliação de medidas reológicas em viscosímetro online. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.** Disponível em: <https://tede.ufrj.br/jspui/handle/jspui/2145>.

OE, M. *et al.* Oral hyaluronan relieves knee pain: A review. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 11, 2016.

PALUMBO, F. S. *et al.* Self-assembling and auto-crosslinkable hyaluronic acid hydrogels with a fibrillar structure. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 1, p. 195–204, 2010.

PANDOCHI, L. Estudo do comportamento coloidal de suspensão de fibra de celulose, carbonato de cálcio, amido catiônico: variação da força iônica e do pH. **Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2009.** Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/92067>.

PANKIEWICZ, R. *et al.* First isolation of polysaccharidic ulvans from the cell walls of freshwater algae. **Algal Research**, v. 19, p. 348–354, 2016.

PAULERT, R. *et al.* Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean

(*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 116, n. 6, p. 263–270, 2009.

PILLONI, A. *et al.* Effectiveness of adjunctive hyaluronic acid application in coronally advanced flap in Miller class I single gingival recession sites: a randomized controlled clinical trial. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n. 3, p. 1133–1141, 2019.

POPA, E. G.; REIS, R. L.; GOMES, M. E. Seaweed polysaccharide-based hydrogels used for the regeneration of articular cartilage. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 410–424, 2015.

RADHAKUMARY, C.; NANDKUMAR, A. M.; NAIR, P. D. Hyaluronic acid-g-poly(HEMA) copolymer with potential implications for lung tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 2, p. 439–445, 2011.

SADHASIVAM, G. *et al.* Isolation and characterization of hyaluronic acid from the liver of marine stingray *Aetobatus narinari*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, p. 84–89, 2013.

SANTOS, A. S. O. DOS. Estudo comparativo entre extração Soxhlet e ultra-som para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em sedimentos do estuário do rio Sergipe por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. **Dissertação - Núcleo de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe**, p. 97, 2011.

SANTOS, F. A. DOS; TAVARES, M. I. B. Preparo e caracterização de filmes obtidos a partir de poli(ácido láctico) e celulose microcristalina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 23, n. 2, p. 229–235, 2013.

SARKAR, S. K. Marine algal bloom: Characteristics, causes and climate change impacts. **Marine Algal Bloom: Characteristics, Causes and Climate Change Impacts**, p. 1–172, 2018.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SHAHARYAR, Y. *et al.* Elucidating the Effect of Iron Speciation ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) on Crystallization Kinetics of Sodium Aluminosilicate Glasses. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 99, n. 7, p. 2306–2315, 2016.

SILVA, A. S. B. DA. Desenvolvimento de ferramentas computacionais para análise de perfis de difração de raios X. **Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo**, 2018.

SILVA, D. *et al.* Caracterização físico-química e microestrutura de conchas de moluscos bivalves. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1053–1058, 2010.

SOLL, D. B.; HARRISON, S. E. **Protection of human and animal cells during**

surgical trauma. Depositors: David B. Soll e Sol E. Harrison. US4971955A. Deposit date: mar. 02, 1988. Patent grant date: nov. 20, 1990.

SOUZA, J. F. DE. Desenvolvimento e avaliação de nanopartículas cristalinas líquidas, liotrópicas, para veiculação e liberação de curcumina. **Dissertação - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba**, 2017.

STEINHAGEN, S. *et al.* Conspecificity of the model organism *Ulva mutabilis* and *Ulva compressa* (Ulvophyceae, Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 55, n. 1, p. 25–36, 2019.

SUPONIK, T. *et al.* The testing of waste from the installation of salt debris leaching. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 427, n. 1, p. 012040, 2018.

THANH, T. T. T. *et al.* Structure and cytotoxic activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 695–702, 2016.

THU, Q. T. M. *et al.* Effect of Sulfation on the Structure and Anticoagulant Activity of Ulvan Extracted From Green Seaweed *Ulva Reticulata*. **Vietnam Journal of Science and Technology**, v. 54, n. 2C, p. 373, 2016.

TIAN, H. *et al.* Isolation, structure, and surfactant properties of polysaccharides from *Ulva lactuca* L. from South China Sea. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 577–582, 2015.

TRAN, T. T. VAN *et al.* Structure, conformation in aqueous solution and antimicrobial activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva reticulata*. **Natural Product Research**, v. 32, n. 19, p. 2291–2296, 2018.

TSUBAKI, S. *et al.* Functional group dependent dielectric properties of sulfated hydrocolloids extracted from green macroalgal biomass. **Carbohydrate Polymers**, v. 107, n. 1, p. 192–197, 2014.

TSUBAKI, S. *et al.* Microwave-assisted hydrothermal extraction of sulfated polysaccharides from *Ulva spp.* and *Monostroma latissimum*. **Food Chemistry**, v. 210, p. 311–316, 2016.

TZIVELEKA, L.-A. *et al.* Marine sulfated polysaccharides as versatile polyelectrolytes for the development of drug delivery nanoplateforms: Complexation of ulvan with lysozyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 69–75, 2018.

UR-REHMAN, T.; TAVELIN, S.; GRÖBNER, G. Effect of DMSO on micellization, gelation and drug release profile of Poloxamer 407. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 394, n. 1–2, p. 92–98, 2010.

WANG, D. A. *et al.* Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue-

biomaterial integration. **Nature Materials**, v. 6, n. 5, p. 385–392, 2007.

WANG, J. *et al.* A comparative study of thermolysis characteristics and kinetics of seaweeds and fir wood. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1883–1886, 2006.

YADAV, R. *et al.* Body armour materials: from steel to contemporary biomimetic systems. **RSC Advances**, v. 6, n. 116, p. 115145–115174, 2016.

YAHYAEI, B. *et al.* Production , assessment , and impregnation of hyaluronic acid with silver nanoparticles that were produced by *Streptococcus pyogenes* for tissue engineering applications. **Applied Biological Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 227–237, 2016.

YAICH, H. *et al.* Impact of extraction procedures on the chemical, rheological and textural properties of ulvan from *Ulva lactuca* of Tunisia coast. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 53–63, 2014.

YAICH, H. *et al.* Effect of extraction procedures on structural, thermal and antioxidant properties of ulvan from *Ulva lactuca* collected in Monastir coast. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1430–1439, 2017.

YILDIRIM, S. *et al.* Effect of Topically-Applied Hyaluronic-Acid on Pain and Palatal Epithelial Wound Healing: An Examiner-Blind, Randomized, Controlled Clinical Trial. **Journal of Periodontology**, v. 89, n. 1, p. 36–45, 2018.

ZHANG, Z.; HUANG, G. Micro- and nano-carrier mediated intra-articular drug delivery systems for the treatment of osteoarthritis. **Journal of Nanotechnology**, v. 2012, 2012.