

# Hidrogeis Nanocompósitos de Alginato/Nanocelulose/Bixinia

## Nanocomposite Hydrogels of Alginate/Nanocellulose/Bixin

Géssica C. S. Costa,<sup>a</sup> Thaís M. Arantes,<sup>b</sup> Tatiane M. Arantes,<sup>a</sup> Erika C. Resende,<sup>b</sup> Gildiberto M. de Oliveira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal de Jataí, Programa de Pós-graduação em Química, CEP 75801-615, Jataí-GO, Brasil.

<sup>b</sup>Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia Goiano, Campus Iporá, CEP 76200-000, Iporá-GO, Brasil.

\*E-mail: gildiberto\_oliveria@ufj.edu.br

Recebido em: 23 de Junho de 2022

Aceito em: 17 de Outubro de 2022

Publicado online: 23 de Novembro de 2022

This work reports the results for the synthesis of the nanocomposite hydrogel of alginate/nanocellulose/bixin and their characterization by scanning electron microscopy, thermal analysis, degree of swelling, gel fraction and mass loss. Bixin was extracted from the seeds of *Bixa orellana L.*, popularly known as annatto, and nanocellulose was produced from sugarcane bagasse. The methodology used in the purification of bixin was crystallization/recrystallization, with a yield of 9.4% relative to the annatto extracted from the seeds. Analysis by infrared spectroscopy and by high performance liquid chromatography indicated that the bixin had high purity. Nanocelluloses were obtained by pulping, bleaching and acid hydrolysis of sugarcane bagasse fiber. The nanocomposites of alginate/nanocelluloses/bixin showed swelling behavior at neutral and alkaline media, but no swelling was observed at acid medium. Moreover, the presence of nanocellulose and/or bixin decreased the degree of swelling, indicating their incorporation at the alginate matrix. According to the SEM micrographs, porosity was observed in the nanocomposite morphology, indicating the possibility of the incorporation of macromolecules, tissue and cells. DTA-TG curves indicated that the nanocomposite showed good thermal stability until 200 °C and the DSC indicated that the vitreous transition and the melting temperatures of the nanocomposites were 148 and 294 °C, respectively.

**Keywords:** Nanocomposite; nanocelluloses; bixin; hydrogels; alginate.

### 1. Introdução

Os nanocompósitos têm se mostrado uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos biomateriais, por possibilitarem: a liberação controlada de fármacos; o encapsulamento de células ou pequenos tecidos e a manutenção da integridade e proliferação celular no sítio de ação.<sup>1</sup> De acordo com Li e Mooney,<sup>2</sup> os nanocompósitos permitem controlar a liberação de agentes terapêuticos espacialmente e temporalmente, devido às suas propriedades físico-químicas ajustáveis. Assim, a investigação de rotas de síntese de nanomateriais torna-se de suma importância para o desenvolvimento dessa área aplicada à saúde.

Nesse contexto, podem ser mencionados os nanocompósitos obtidos com alginato.<sup>3,4</sup> O alginato é um copolímero constituído por várias unidades de sais de ácido β-D-manurônico (M) e α-L-gulurônico (G) unidas por ligações glicosídicas.<sup>3</sup> Os compósitos de alginato são amplamente utilizados na engenharia de tecido, por possuirem alta porosidade, capacidade de biodegradar em condições biológicas normais e de propiciar regeneração celular. O alginato pode formar ligações covalentes e iônicas na matriz polimérica, porém os hidrogéis de alginato possuem baixa resistência mecânica, liberação rápida do fármaco e baixa capacidade de adesão celular.<sup>3</sup> Nesse sentido, os nanocompósitos de alginatos são desejados, como é o caso dos obtidos com nanocelulose. Assim, a combinação das propriedades mecânicas da nanocelulose com alginato pode originar um biomaterial mais resistente, haja visto que a nanocelulose possui excelente desempenho mecânico, alta área superficial, natureza hidrofílica e citocompatibilidade, além de favorecer a estabilidade dimensional, gelificação, resistência mecânica e facilitar a liberação de drogas.<sup>4</sup> Portanto, o nanocompósito de alginato e nanocelulose é um biomaterial promissor, pois já possuem propriedades terapêuticas, como descritas anteriormente.<sup>3,4</sup>

Neste trabalho, buscou-se investigar a associação ao nanocompósito alginato/nanocelulose de um componente que pudesse indicar o uso deste como biomaterial carreador de drogas, como o caso de um componente com conhecido efeito antioxidante e antiinflamatório. Assim, foi associado ao nanocompósito a bixina, que é um carotenóide encontrado nas sementes de *Bixa orellana L.*, popularmente conhecido como urucum. A bixina é um antioxidante que apresenta efeito protetor contra agentes mutagênicos, inibe os níveis de glicose no sangue em ratos, inibe lesões ateroscleróticas em coelhos e diminui o estresse oxidativo, melhorando assim

a inflamação da dislipidemia (gorduras no sangue).<sup>5,6</sup> Outro ponto importante está relacionada ao fato da bixina, segundo organização mundial de Saúde (OMS), ser considerada segura para o consumo humano.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi preparar nanocompósitos de alginato/nanocelulose/bixina para a formação de hidrogéis e caracterizá-los por microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise térmica diferencial e termogravimétrica (DTA-TA), calorimetria diferencial exploratória (DSC), como também, avaliar o grau de intumescimento (GI), fração gel (FG) e perda de massa (PM).

## 2. Parte Experimental

### 2.1. Materiais e métodos

Neste trabalho foram utilizados os reagentes químicos, em grau analíticos: clorofórmio, diclorometano e cloreto de sódio (Vetec), etanol (Neon), alginato de sódio (Inlab), cicloexano (Synth), hidróxido de sódio, ácido acético glacial, ácido sulfúrico, ácido bórico e ácido clorídrico (Alphatec), clorito de sódio, brometo de potássio e cloreto de cálcio anidro (Sigma-Aldrich).

Os materiais de partida, bixina<sup>7,8</sup> e nanocelulose,<sup>9</sup> extraídos ou sintetizados a partir de produtos naturais e os nanocompósitos de alginatos sintetizados<sup>3,4,10</sup> foram caracterizados utilizando-se: *i*) espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) (Espectrôfotômetro Shimadzu modelo IR Affinity-1), empregando-se o método de pastilhas de KBr 1% e sem pastilha, sendo os espectros obtidos no modo de transmitância na região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>;<sup>11-15</sup> *ii*) cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE - Shimadzu) com detector de fotodiódos (CLAE-DAD), injetor automático e bomba quaternária, utilizando-se uma coluna C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) acoplada a pré-coluna Shim-pack GVP-ODS (10 x 4,6 mm), sendo a fase móvel: acetonitrila (grau HPLC, LSChemicals) e água ultra purificada acidificada (2% com ácido acético (grau UV-HPLC, ProQuímicos)) na proporção 75:25 (v:v), com fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, injeção de 20 µL, temperatura do forno de 30 °C, varredura na faixa de 250 e 660 nm e leituras monitoradas em quatro comprimentos de onda: 254, 456, 460 e 500 nm;<sup>7,8,16,17</sup> *iii*) microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando-se o aparelho JSM – 6610 (Jeol), equipado com EDS, Thermo Scientific NSS Spectral Imaging; *iv*) análises térmicas diferencial e termogravimétrica (DTA-TA), empregando-se o equipamento Netzsch STA 449 F3 Nevio, no intervalo de temperatura de 30 a 600 °C, com taxa de aquecimento de 10 K min<sup>-1</sup>, em atmosfera de gás nitrogênio com vazão de 50 mL min<sup>-1</sup>; *v*) análises de calorimetria diferencial por varredura (DSC),<sup>18</sup> empregando o equipamento Netzsch DSC 204 F1 Nevio, no intervalo de temperatura de 30

a 500 °C, com taxa de aquecimento de 10 K min<sup>-1</sup>, em cadrinho de alumínio com tampa perfurada, em atmosfera de gás nitrogênio com vazão de 60 mL min<sup>-1</sup> e *vi*) análises do grau de intumescimento (GI), fração gel (FG) e perda de massa (PM), empregando-se temperatura controlada a 37 °C em banho Maria, com as amostras pesadas e colocadas em bêquer com 100 mL de água destilada. No intervalo de tempo de 1 a 72 horas, as amostras foram retiradas dos bêqueres, secas com papel filtro, pesadas e recolocadas novamente dentro do bêquer e, ao final de 72 h, as amostras foram secas em estufa a 50 °C por 36 h, seguida por medidas de suas massas.<sup>19-33</sup> Os ensaios de GI, FG e PM foram realizados somente em amostras obtidas em meio neutro e alcalino, porque o nanocompósito obtido em meio ácido não gelificou durante a secagem, não apresentando característica de intumescimento.<sup>10</sup>

O grau de intumescimento (GI) é um parâmetro que permite observar o perfil de hidratação dos nanocompósitos. A hidratação ocorre quando as moléculas do solvente penetram na matriz polimérica, ocupando as regiões do interstício da rede polimérica podendo causar dissolução ou desintegração na estrutura à medida que aumenta o volume de água na estrutura do hidrogel. O GI é calculado conforme a Equação 1.<sup>34</sup>

$$GI(\%) = \left( \frac{m_i - m_s}{m_s} \right) \times 100 \quad (1)$$

onde m<sub>i</sub> é a massa da amostra intumescida, m<sub>s</sub> é massa da amostra seca (antes de iniciar o ensaio).

A fração do gel (FG) indica indiretamente o grau de reticulação do polímero (Equação 2).

$$FG(\%) = \frac{m_{is}}{m_s} \times 100 \quad (2)$$

onde, m<sub>is</sub> é a massa seca após o último instante do ensaio de intumescimento.

A perda de massa (PM) está relacionada com a degradação hidrofílica do nanocompósito e com a liberação de substância ativa presente na estrutura (Equação 3).

$$PM(\%) = \frac{m_s - m_{is}}{m_s} \times 100 \quad (3)$$

### 2.2. Extração de bixina

*O annatto* foi extraído das sementes do urucum (*Bixa orellana L.*),<sup>7,8</sup> em extrator Soxhlet utilizando clorofórmio como solvente, por meio de cinco extrações sucessivas. A purificação da bixina ocorreu pela cristalização/recristalização utilizando diclorometano e etanol absoluto na proporção de 1:4. A bixina foi caracterizada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) e o grau de pureza da bixina foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### 2.3. Síntese de nanoceluloses

A preparação da nanocelulose a partir do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada como descrita por Arantes.<sup>9</sup> Para tanto, primeiramente, foi realizada a extração, a polpação e o branqueamento da fibra do bagaço de cana-de-açúcar e, posteriormente, a obtenção da nanocelulose por meio da hidrólise ácida. A nanocelulose foi caracterizada por IV-TF.

### 2.4. Síntese dos nanocompósitos

No preparo dos nanocompósitos foram utilizadas soluções de: alginato de sódio a 2% (m/v); nanocelulose a 1% (m/v); cloreto de cálcio anidro a 2% (m/v); ácido bórico + cloreto de potássio (pH 9,2) e de ácido clorídrico + cloreto de sódio (pH 2,0).

O uso de nanocelulose em nanocompósitos é bem descrito na literatura, incluindo o caso da associação com alginato,<sup>3,4,10</sup> porém não verifica-se a inserção da bixina. Os hidrogéis de alginato foram obtidos pela formação de reticulação iônica alcançada pela presença de íons cálcios adicionados no processo de síntese.<sup>3</sup> A acidez do meio também pode influenciar as características de reticulação dos hidrogéis de alginato, para tanto também foi avaliada a acidez do meio (ácido, neutro e básico).<sup>10</sup> Neste trabalho os nanocompósitos foram preparados sob agitação mecânica da solução de alginato de sódio e adição das soluções de bixina, nanocelulose, cloreto de cálcio e solução com pH 2,0 ou 9,2. Para os nanocompósitos “neutro” não foi adicionado solução com pH 2,0 ou 9,2. A Tabela 1 apresenta as composições de preparos dos nanocompósitos. Os nanocompósitos foram caracterizados por: microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise térmica diferencial e termogravimétrica (DTA-TG), calorimetria diferencial exploratória (DSC), grau de intumescimento (GI), fração gel (FG) e perda de massa (PM).

**Tabela 1.** Composições nos preparamos dos materiais e nanocompósitos

Amostra	Alginato de sódio 2% (mL)	Bixina (mg)	Nanocelulose 1% (mL)	Cloreto de Cálcio 2% (mL)	Solução pH 2,0 (mL)	Solução pH 9,2 (mL)
Alg <sup>a</sup>	90	-	-	100	-	50
Alg/Nano <sup>b</sup>	90	-	10	100	-	50
Alg/Bx <sup>c</sup>	90	50	-	100	-	50
Alg/Bx/Nano	90	50	10	100	-	50
Alg-1	90	-	-	100	50	-
Al/Nano-1	90	-	10	100	50	-
Alg/Bx-1	90	50	-	100	50	-
Alg/Bx/Nano-1	90	50	10	100	50	-
Alg-2	90	-	-	100	-	-
Al/Nano-2	90	-	10	100	-	-
Alg/Bx-2	90	50	-	100	-	-
Alg/Bx/Nano-2	90	50	10	100	-	-

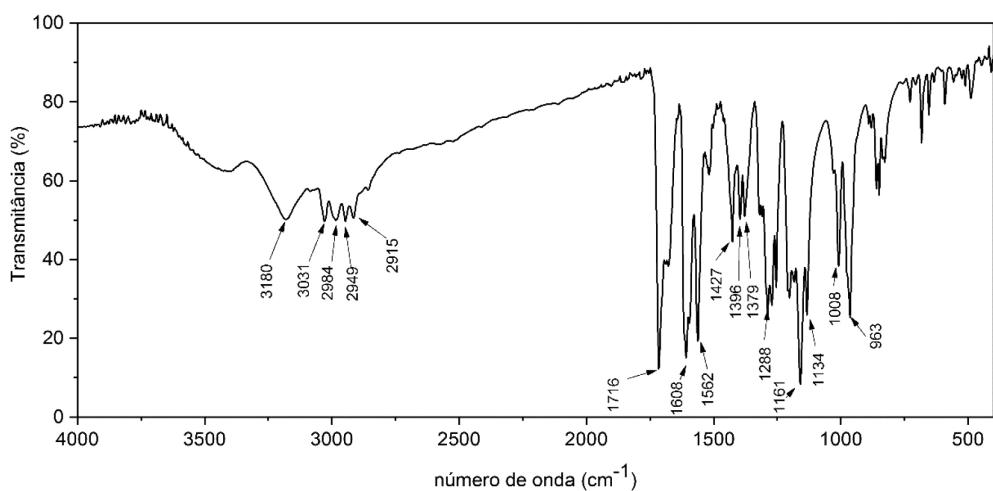
<sup>a</sup>Alginato; <sup>b</sup>nanocelulose; <sup>c</sup>bixina.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Extração e caracterização de bixina

O *annatto* foi extraído das sementes de urucum (*Bixa orellana L.*)<sup>7,8</sup> seguido por purificação da bixina por cristalização/recristalização, tendo apresentado rendimento de 9,4% de bixina em relação ao *annatto* extraído. A bixina é o principal componente encontrado no *annatto* (responsável por 80% dos carotenoides presentes nas sementes), podendo estar presente outros carotenoides, como a norbixina, apo-Ψ-caroteno, β-caroteno, criptoantina, zeaxantina, fitoeno, luteína e o geranilgeraniol.<sup>35</sup> Barbosa-Filho e colaboradores<sup>35</sup> extraíram bixinas de diferentes variedades de urucum em extrator Soxhlet utilizando o clorofórmio como solvente, obtendo um rendimento de bixina cristalizada de 0,07 a 1,3%. Golin e colaboradores<sup>36</sup> extraíram bixina via Soxhlet com diferentes solventes, na fração extraída com clorofórmio obteve um rendimento de 5,07% de bixina. O maior rendimento obtido neste procedimento pode estar relacionado as extrações sucessivas, que levou uma maior quantidade de material extraído das sementes do urucum. Os cristais de bixina foram analisados por espectrometria no infravermelho (Figura 1 e Tabela 2) e por CLAE (Figura 2).

A Figura 1 apresenta o espectro de absorção molecular no infravermelho para a bixina recristalizada e a Tabela 2 as correlações dos tipos de vibrações moleculares com as principais regiões de absorção molecular, relativas a: 3180 cm<sup>-1</sup> (estiramento do O-H do grupo COOH), 3030, 2985 cm<sup>-1</sup> (estiramento C-H sp<sup>2</sup>); 2945, 2914 cm<sup>-1</sup> (estiramento C-H sp<sup>3</sup> do grupo metila).<sup>11</sup> Ainda, na região de 1716 cm<sup>-1</sup> (estiramento C=O do grupo COOH) e na região de 1608 cm<sup>-1</sup> (estiramento C=O do grupo COOR) foram identificados as bandas relativas a carbonila (C=O) dos dois grupos funcionais (ácido carboxílico e éster) existentes na bixina, enquanto na região de 1562 cm<sup>-1</sup>,



**Figura 1.** Espectro de absorção molecular no infravermelho da bixina recristalizada

**Tabela 2.** Principais bandas de absorção no infravermelho da bixina

Números de onda (cm <sup>-1</sup> )	Tipos de vibração
3180	Estiramento do O-H do grupo COOH
3031 - 2984	Estiramento C-H sp <sup>2</sup>
2949 - 2915	Estiramento C-H sp <sup>3</sup> do grupo metila
1716	Estiramento C=O do grupo COOH
1608	Estiramento C=O do grupo COOR
1562	Estiramento C=C dos dienos conjugados
1427	Dobramento C-O-H do grupo COOH
1396 – 1379	Dobramento do grupo -CH <sub>3</sub>
1288	Estiramento C-O do grupo COOH
1161 - 1134	Estiramento C-O do grupo COOR
1008 - 963	Dobramento C-H do sp <sup>2</sup>

tem-se o estiramento C=C dos dienos conjugados. Estes resultados foram similares aos encontrados por Santos,<sup>11</sup> Costa e Chaves,<sup>12</sup> e Fonseca *et al.*,<sup>13</sup> indicando que o material recristalizado contém a bixina.

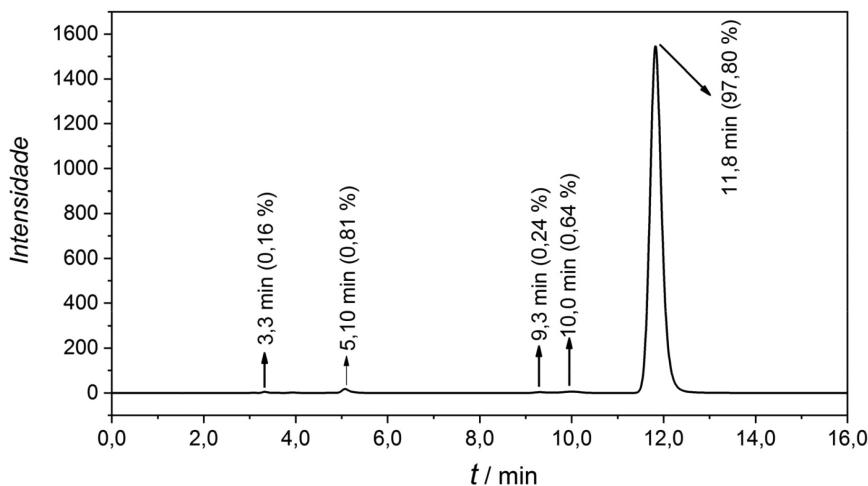
Adicionalmente, a bixina foi caracterizada por cromatografia líquida de alta eficiência com a finalidade de avaliar sua pureza (Figura 2). Pode-se verificar na Figura 2 um pico no tempo de retenção de 11,8 minutos (área relativa de pico de 97,80%), simétrico e com ausência de cauda, como também, não são observados outros picos significativos (verifica-se somente picos com áreas relativas menores que 1%). Ademais, em 11,8 minutos verifica-se uma pureza de pico de 99,9984%, cujo o espectro de UV-Vis obtido neste tempo de retenção é apresentado na Figura 3 (curva em preto). Verifica-se na Figura 3 (curva em preto) a sobreposição de três bandas características da bixina,<sup>7,16,17</sup> com os picos de absorção em 435, 460 e 487 nm. Um espectro similar também foi obtido realizando-se a medida de espectrofotometria em solução preparada com a dissolução da bixina recristalizada em clorofórmio (Figura 3, curva em vermelho), observando-se essas três bandas características. Este perfil de espectro UV-Vis (Figura 3) para bixina também foi encontrado por Rios e Mercadante,<sup>7</sup> Chisté *et*

*al.*<sup>14</sup> e Silva.<sup>15</sup> Desse modo, considerando-se que o pico em 11,8 min é devido à bixina, sugere-se uma alta pureza para a bixina.<sup>37</sup> Resultado similar em pureza para bixina após recristalização também foi obtido por Mercante e Rios,<sup>7</sup> utilizando a recristalização com diclorometano/etanol absoluto (1:4) como meio de purificação, tendo sido obtida pureza de 98%.

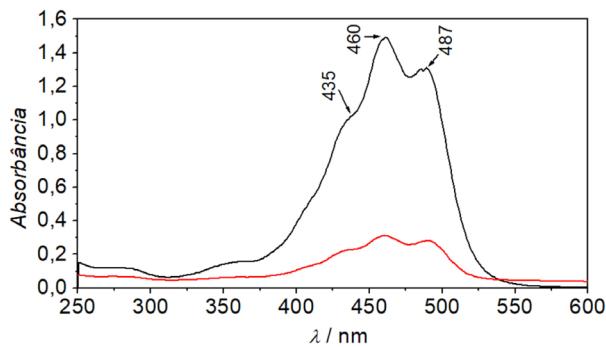
Portanto, as análises por espectroscopia no infravermelho e por cromatografia sugerem que a bixina recristalizada apresenta alta pureza, o que viabiliza seu uso no preparo dos hidrogéis nanocompósitos.

### 3.2. Síntese e caracterização de nanoceluloses

A metodologia de obtenção da nanocelulose foi desenvolvida por Arantes (2018).<sup>9</sup> As nanoceluloses preparadas neste trabalho foram analisadas por espectroscopia de infravermelho (Figura 4), cujas principais regiões de absorção estão descritas na Tabela 3. De acordo com Santos<sup>13</sup> e Sain e Panthapulakkal<sup>14</sup> a ausência da banda em 1730 cm<sup>-1</sup> indica a remoção da hemicelulose e da lignina pela hidrólise ácida pois, os grupos acetil, urônico, éster urônico da hemicelulose e componentes fenólicos da lignina absorvem nesta região,



**Figura 2.** Cromatograma obtido por CLAE-DAD a 460 nm da bixina recristalizada a 100 mg/mL



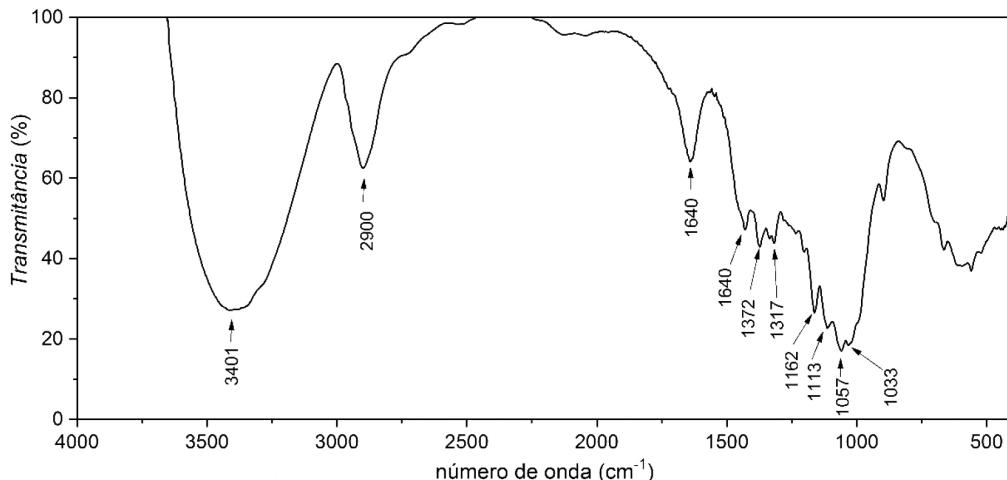
**Figura 3.** Espectro de UV-Vis obtido: (curva em preto) por CLAE-DAD no tempo de 11,8 min e (curva em vermelho) com bixina recristalizada solubilizada em clorofórmio

sendo este um indicativo da formação de nanoceluloses pela hidrólise ácida.

### 3.3. Síntese e caracterização de nanocompósitos

Os ensaios de intumescimento foram realizados somente com os nanocompósitos básicos e neutros, em temperatura

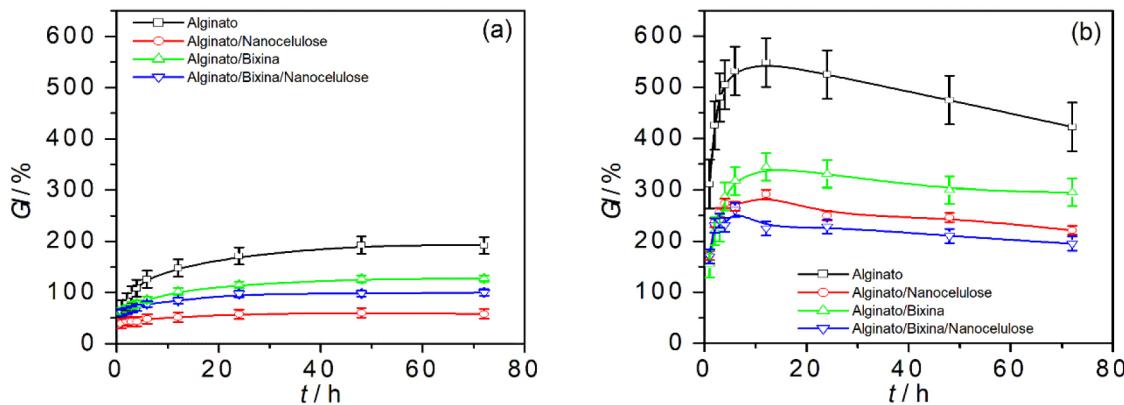
controlada a 37 °C, conforme descrito na metodologia (seção 2.1.). As Figuras 5(a) e 5(b) apresentam os gráficos do grau de intumescimento (GI) em função do tempo de imersão em água para os materiais preparados em meio básico e neutro, respectivamente. De modo geral, verifica-se que os materiais obtidos em meio neutro (Figura 5(b)) apresentaram maiores valores de GI, comparados aos obtidos em meio básico (Figura 5(a)). Verifica-se também uma menor capacidade de intumescimento para os nanocompósitos (dados em vermelho e azul), comparada ao alginato (dados em preto), seja em pH neutro ou alcalino. A capacidade de interação e expansão do gel durante a hidratação (intumescimento) depende da composição do polímero que forma a estrutura do gel e da composição da solução de intumescimento (acidez do meio e força iônica).<sup>3</sup> Deve-se mencionar também que a composição da síntese (acidez do meio e concentração de íons cálcios, como no caso dos hidrogéis de algíntio)<sup>3,10</sup> pode influenciar a formação dos hidrogéis e suas características hidrofílicas e de estrutura morfológica. Além disso, ao adicionar outras substâncias (bixina e nanoceluloses, entre outras) na estrutura polimérica do alginato, estas se encontram no caminho em que as moléculas de água iriam percorrer



**Figura 4.** Espectro de absorção molecular no infravermelho da nanocelulose.

**Tabela 3.** Principais bandas de absorção no infravermelho das nanoceluloses

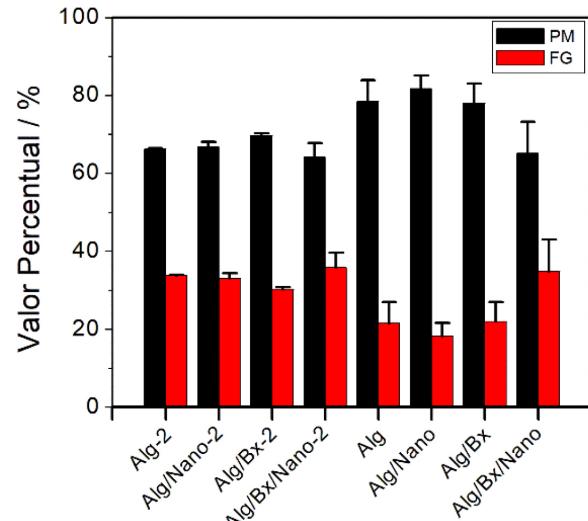
Números de onda (cm <sup>-1</sup> )	Tipos de vibrações
3401	Estiramento da ligação O-H
2900	Estiramento da ligação C-H
1640	Grupo O-H pela deformação angular
1429 a 1317	Deformação angular simétrica do grupo CH <sub>2</sub> e deformação angular das ligações C-O e C-H
1162 a 1033	Estiramento do C-O e deformação angular da ligação C-H

**Figura 5.** Grau de intumescimento dos materiais obtidos em meio básico (a) e neutro (b)

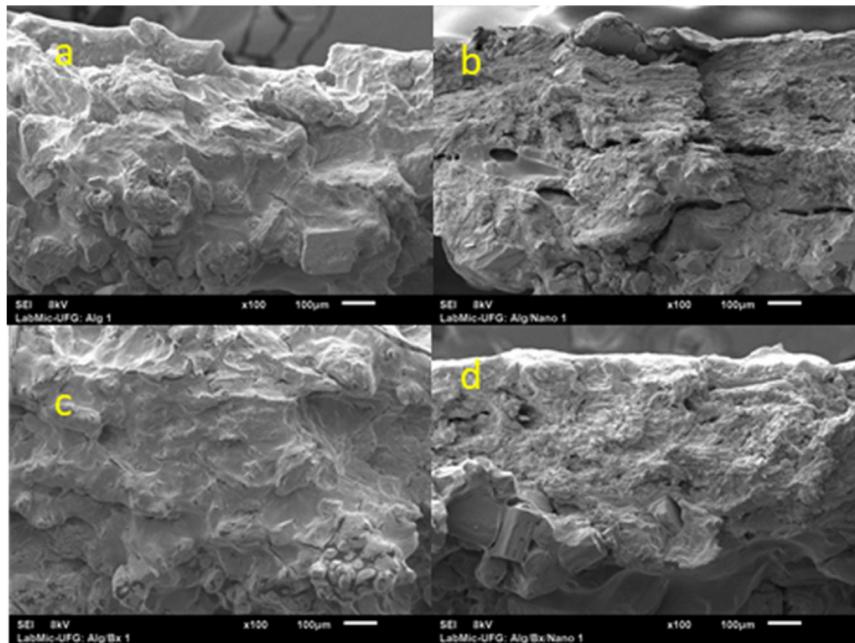
para preencher os espaços vazios, podendo assim diminuir a capacidade de intumescimento.<sup>19</sup> Portanto, as diferenças em grau de intumescimento dos materiais preparados em meio neutro e básico possivelmente estão relacionadas as alterações nas características químicas das superfícies internas na matriz polimérica do alginato e de reticulação iônica, haja visto que do ponto de vista morfológicos, ambos materiais apresentaram características similares (conforme discutido na Figura 8, na análise por MEV). Pode-se verificar ainda que a adição de bixina ao aginato leva ao decréscimo no valor de GI (Figuras 5(a) e 5(b), dados em verde), indicando que a bixina foi incorporada a matriz polimérica de alginato. Também pode ser verificado na Figura 5(b) que as amostras neutras começaram a se desintegrar após 12 h de ensaio (verificado pelo decréscimo no GI), o qual pode estar relacionada com a fração gel e a perda de massa durante o ensaio.

A fração gel e a perda de massa das amostras ao final do ensaio (Figura 6) indicam, indiretamente o grau de reticulação do polímero e a degradação hidrofílica do nanocompósito e que pode afetar a liberação de substância ativa presente na estrutura. Os hidrogéis que contém fármacos e outros substâncias não é possível comparar a fração gel diretamente, pois além do agente reticulante, existe outras substâncias que podem interagir com a estrutura polimérica, que causaria maior ancoramento de cadeias e aumento da fração gel.<sup>2</sup>

A perda de massa está relacionada com a degradação do hidrogel e com a liberação de substâncias ativas.<sup>34</sup> Considerando-se o erro experimental, não tiveram

**Figura 6.** Fração gel (FG) e perda de massa (PM) para amostra preparadas em meio básico (Alg; Alg-Nano; Alg/Bx; Alg/Bx/Nano) e meio neutro (Alg-2; Alg-Nano-2; Alg/Bx-2; Alg/Bx/Nano-2)

diferenças significativas entre amostras obtidas em meio neutro (Alg-2; Alg-Nano-2; Alg/Bx-2; Alg/Bx/Nano-2) ou entre amostras obtidas em meio básico (Alg; Alg-Nano; Alg/Bx; Alg/Bx/Nano), sendo que o valor médio global para amostras em meio básico e neutro foram de 66 e 76%, respectivamente. Esta perda de massa está relacionada a degradação/desintegração da estrutura polimérica e não a liberação de bixina. Foi avaliado a liberação de bixina do ensaio de intumescimento dos nanocompósitos que tem bixina, analisando-se por CLAE-DAD as alíquotas retiradas



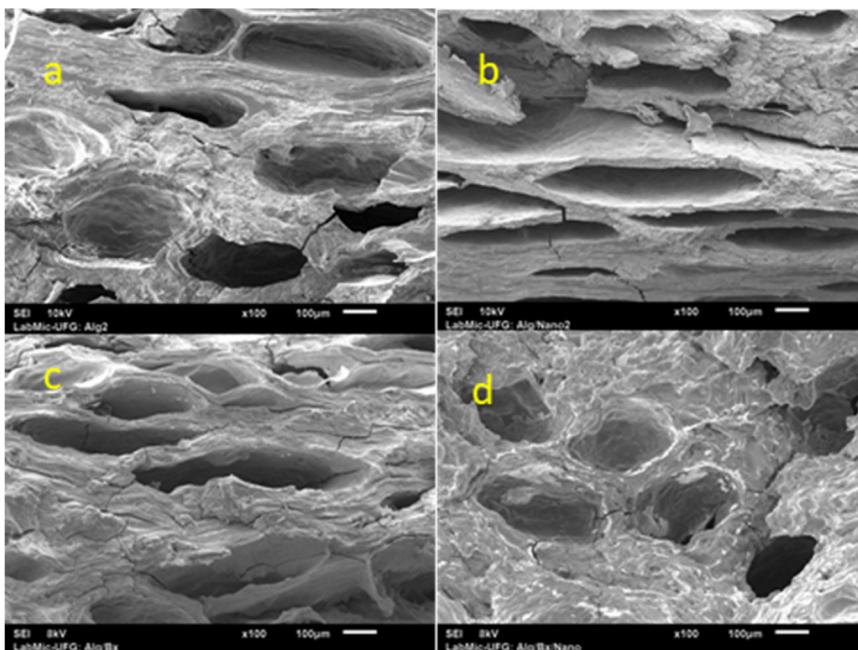
**Figura 7.** Micrografias dos nanocompósitos adicionado solução ácida. a) Alg-1; b) Alg/Nano-1; c) Alg/Bx-1; d) Alg/Bx/Nano-1

após a realização do ensaio de intumescimento (72 h). Nas amostras de Alg/Bx/Nano; Alg/Bx/Nano-2 e Alg/Bx-2 não foram detectados picos de bixina nos cromatogramas. Já para a amostra Alg/Bx foi verificado um pico com baixa intensidade no tempo de retenção da bixina (11,8 min), entretanto, não foi possível realizar a quantificação uma vez que ficou abaixo da faixa de linearidade das curvas de calibração.

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram usadas para avaliar a morfologia dos hidro-

géis, seja com relação as características das superfícies dos hidrogéis, como a presença ou não de fraturas. Nos nanocompósitos que foram adicionados solução ácida apresentaram rachaduras nas superfícies e pequenos poros, o qual podem ser atribuídos a dissolução do polímero em meio ácido (Figuras 7(a)-(d)).<sup>31</sup>

Os nanocompósitos neutros e básicos apresentaram poros com paredes largas e rachaduras na estrutura polimérica, além de sais de  $\text{CaCl}_2$  nas superfícies e nas fraturas (Figuras 8(a)-(d)).<sup>20</sup> O tamanho dos poros no hidrogel, a



**Figura 8.** Micrografia dos nanocompósitos neutros e básicos. a) Alg-2; b) Alg/Nano-2; c) Al/Bx; d) Alg/Bx/Nano

distribuição e a interconexão entre eles, contribuir para absorção dos líquidos e a viabilidade celular, contribuindo também para o transporte de nutrientes e fluidos biológicos.<sup>21</sup> Assim, verifica-se que nanocompósitos obtidos a pH neutro e 9,2 apresentam características morfológicas atrativas ao uso desses nanomateriais na biomedicina.

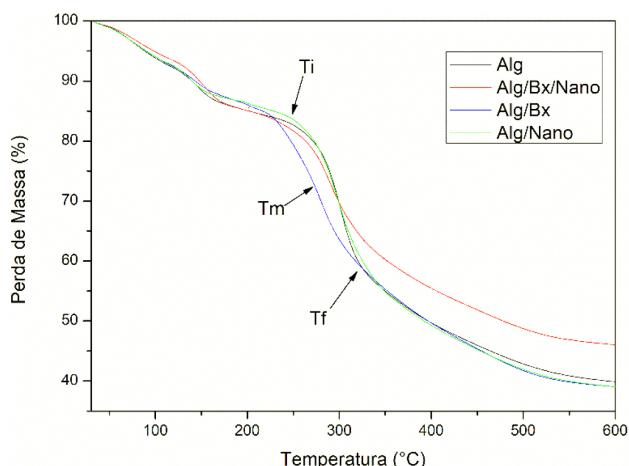
As análises termogravimétricas envolvem a medida de variação de massa em função do tempo e da temperatura, para obter informações sobre a degradação térmica dos materiais.<sup>18</sup> As amostras dos nanocompositos básicos analisadas no DTA-TG apresentaram perda de massa em três principais eventos de degradação, o que mostra a estabilidade térmica do nanocompósito. Na Figura 9 estão indicados: a  $T_i$ , que é a temperatura de início da degradação do nanocompósito; a  $T_m$ , que é a temperatura de máxima degradação, correspondendo ao pico do terceiro evento de degradação observado na Figura 10, e a  $T_f$ , que é a temperatura final do processo de degradação.

O primeiro evento ( $1^\circ$ ), que ocorre a cerca de 80°C, é referente à perda de água e outros componentes voláteis presentes na estrutura, sendo observado em todas as amostras analisadas e também a primeira degradação dos

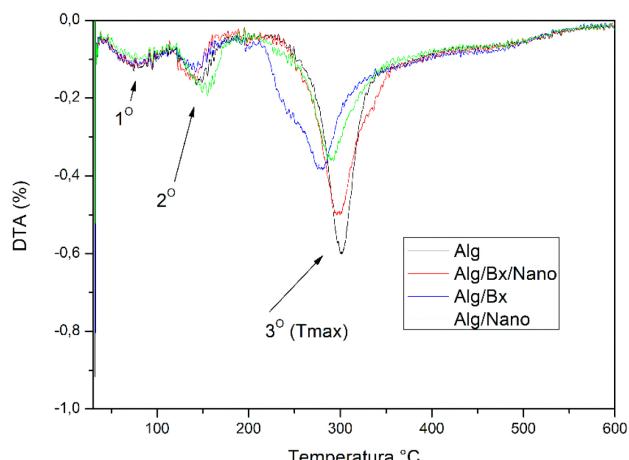
oligossacarídeos.<sup>22-25</sup> No segundo evento ( $2^\circ$ ), a cerca de 150 °C, ocorre a perda de massa referente da degradação complexa dos glicosídeos presentes na estrutura do alginato e da nanocelulose, de bixina e da água estrutural.<sup>26-29</sup> A perda de massa no terceiro evento ( $3^\circ$ ), que ocorre em aproximadamente 300 °C, está relacionada com a degradação das ligações glicosídicas do alginato, da nacocelulose e da bixina presente na amostra de nanocompósito de alginato de cálcio, e a oxidação do material carbonáceo do nanocompósito.<sup>26-29</sup>

A calorimetria diferencial exploratória (DSC) pode ser definida como uma técnica que mede a temperatura e o fluxo de calor associado com as transições dos materiais em função da temperatura e do tempo, para as quais se acompanha a variação da energia entre a amostra e a referência, permitindo determinar as temperaturas de transição vítreia ( $T_g$ ), de cristalização ( $T_c$ ) e de fusão ( $T_m$ ). As análises de DSC nos materiais poliméricos permitem avaliar a  $T_g$ , onde as regiões amorfas adquirem mobilidade; a  $T_c$ , onde ocorre a formação de fases cristalinas e a  $T_m$ , onde ocorre as mudanças no estado físico da parte cristalina.<sup>30</sup> Na Tabela 4 e Figura 11 são mostrados os valores da  $T_g$  e  $T_m$  para os materiais e nanocompósitos obtidos a partir da análise de DSC.

A amostra de Alg (Figura 11) apresenta um pico endotérmico (End) em 157,9 e 545,2 °C, e exotérmico (Ext) em 487,9 °C. O Alg/Nano apresentou dois picos exotérmicos (0,6 e 31,1 °C), e três picos endotérmicos (em 172,9, 451,3 e 545,6 °C). O Alg/Bx apresentou picos endotérmicos em 156,6 e 545,3 °C e um pico exotérmico a 490,7 °C. A amostra de Alg/Bx/Nano apresentou picos endotérmicos em 158,7 e 545,2 °C, e um pico exotérmico em 491,3 °C. Pedrosa determinou valores de  $T_g$  para o alginato de cálcio em torno de 152 °C.<sup>32</sup> A temperatura de  $T_g$  varia de acordo com as propriedades de cada polímero, dependendo das interações termodinâmicas do polímero.



**Figura 9.** Curvas termogravimétricas das amostras de Alg, Alg/Nano, Alg/Bx e Alg/Bx/Nano



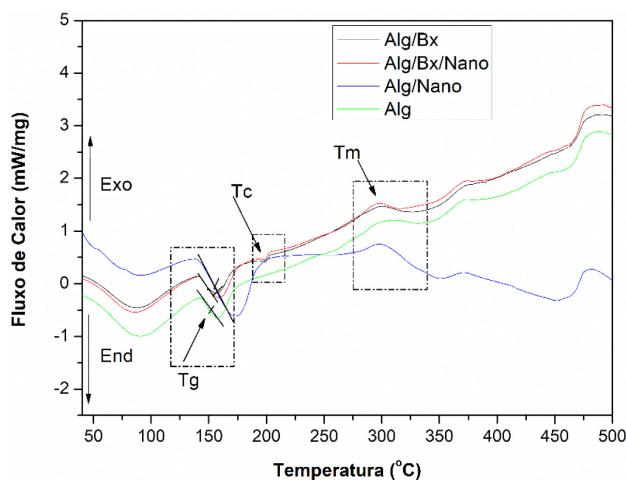
**Figura 10.** Curvas DTA das amostras de Alg, Alg/Nano, Alg/Bx e Alg/Bx/Nano

**Tabela 4.** Valores de  $T_g$ ,  $T_c$  e  $T_m$  dos nanocompósitos

Amostras	$T_g$ (°C) <sup>a</sup>	$T_c$ (°C) <sup>b</sup>	$T_m$ (°C) <sup>c</sup>
Alg	150	---	306
Alg/Nano	158	---	297
Alg/Bx	148	198	302
Alg/Bx/Nano	148	198	294

<sup>a</sup>Temperatura de transição vítreia; <sup>b</sup>temperatura de cristalização; <sup>c</sup>temperatura de fusão

Segundo William e Callister (2002),<sup>38</sup> a temperatura de fusão dos polímeros ocorre numa faixa de temperatura devido a cada polímero ser composto por moléculas que possuem pesos moleculares diferentes, e a temperatura de fusão está relacionada diretamente com o peso molecular. Outro fator que afeta a temperatura de fusão é o nível de ramificação na estrutura polimérica. Sendo assim, a faixa de temperatura para a amostra de Alg foi de 143,7 a 169,9 °C, sendo em 157,9 °C a temperatura da transição de fase. O Alg/Nano possui uma faixa de temperatura de fusão de



**Figure 11.** Curva de DSC dos nanocompósitos

143,9 a 190,8 °C, e em 172,9 °C a temperatura de transição de fase, sendo o nanocompósito com maior temperatura de fusão quando comparado às outras amostras analisadas.

As amostras de Alg/Bx e Alg/Bx/Nano apresentaram uma faixa de temperatura de 146,5 a 168,6 °C e 142,5 a 175,0 °C, com transições de fase em 156,6 e 158,7 °C respectivamente. Essas duas amostras também apresentaram um pico próximo a 200 °C referente a temperatura de fusão da bixina presente na estrutura.<sup>29</sup>

#### 4. Conclusões

A bixina extraída e purificada apresentou um rendimento de 9,4% a partir do *annatto* extraído, sendo que sua caracterização por IV-TF e CLAE-DAD sugere ter alto grau de pureza. As nanocelulose preparadas formam filmes resistentes quando seca. Os nanocompósitos formaram gel a pH neutro e básico, mas não em meio ácido. A inserção de nanocelulose e/ou bixina ao alginato diminui o grau de intumescimento, sendo que em meio neutro os valores de instumescimento foram maiores. Os nanocompósitos preparados em meios neutros e básicos apresentaram perdas de massas de 66 e 76% e fração gel de 33 e 24%, respectivamente.

As análises por MEV mostraram ser possível produzir nanocompósitos com poros, indicativo de que possam incorporar macromoléculas, células e/ou tecidos humanos na sua estrutura, possibilitando sua aplicação em processos de regeneração e liberação controlada. As análises térmicas mostraram estabilidade térmica do nanocompósito de alginato/nanocelulose/bixina até a temperatura de 200 °C, temperatura a partir do qual processos de perda de massa por degradação passam a ocorrer.

Por fim, verificou-se forte incorporação da bixina na matriz polimérica do alginato, que mesmo após 72 h de ensaio de intumescimento não apresentou níveis detectáveis de bixina na solução analisada por CLAE-DAD.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pelo acesso aos portal de periódicos (Código de Financiamento 001); ao CNPq pelo suporte financeiro (Projeto 468063/2014-5); ao Instituto Federal Goiano, campus Iporá-GO/Brasil, pela disponibilidade de laboratórios e análises por IV-TF, UV-Vis e CLAE; ao Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI, Goiânia-GO/Brasil) pela prestação de serviço em análises de DTA e DSC e ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic, Goiânia-GO/Brasil), pela prestação de serviço em análise de MEV.

#### Referências Bibliográficas

- Matricardi, P.; Meo, C. D.; Coviello, T.; Hennink, W. E.; Alhaique, F.; Interpenetrating polymer networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, *65*, 1172. [Crossref]
- Li, J.; Mooney, D. J.; Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials* **2016**, *1*, 16071. [Crossref]
- Siqueira, P.; Siqueira, É.; De Lima, A. E.; Siqueira, G.; Pinzón-Garcia, A. D.; Lopes, A. P.; Botaro, V. R.; Three-dimensional stable alginate-nanocellulose gels for biomedical applications: Towards tunable mechanical properties and cell growing. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 78. [Crossref]
- Naseri, N.; Deepa, B.; Mathew, A. P.; Oksman, K.; Girandon, L.; Nanocellulose-based interpenetrating polymer network IPN hydrogels for cartilage applications. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 3714. [Crossref]
- Roehrs, M.; Figueiredo, C. G.; Zanchi, M. M.; Bochi, G. V.; Moresco, R. N.; Quatrin, A.; Emanuelli, T.; Bixin and norbixin have opposite effects on glycemia, lipidemia, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Endocrinology* **2014**, *2014*, 839095. [Crossref]
- Somacal, S.; Figueiredo, C. G.; Quatrin, A.; Ruviaro, A. R.; Conte, L.; Augusti, P. R.; Emanuelli, T. O.; The antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2015**, *403*, 243. [Crossref]
- Rios, A. O.; Mercadante, A. Z.; Novel method for the determination of added annatto colour in extruded corn snack products. *Food Additives and Contaminants* **2004**, *21*, 125. [Crossref]
- Tocchini, L.; Mercadante, A. Z.; Extração e determinação, por CLAE, de bixinha e norbixinha em coloríficos. *Food Science and Technology* **2001**, *21*, 310. [Crossref]
- Arantes, T. M.; Tese de doutorado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia 2018. [Link]
- Chuang, J. J.; Huang, Y. Y.; Lo, S. H.; Hsu, T. F.; Huang, W. Y.; Huang, S. L.; Lin, Y. S.; Effects of pH on the Shape of Alginate Particles and Its Release Behavior. *International Journal of Polymer Science* **2017**, *2017*, 3902704. [Crossref]

11. Santos, F. K. F.; Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 2013. [\[Link\]](#)
12. Costa, C. L. S.; Chaves, M. H.; Extraction of pigments from seeds of *Bixa orellana L.*: an alternative for experimental courses in organic chemistry. *Química Nova* **2005**, 28, 149. [\[Crossref\]](#)
13. Fonseca, T. N.; Teixeira, P. S.; Moura, E. D.; Geraldo, Á. B. C.; Study of bixin oxidation by ionizing irradiation. *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN /CNEN - SP)* **2017**, 22. [\[link\]](#)
14. Santos, D. F.; Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal da Fronteira Sul Campus Laranjeiras do Sul, 2020. [\[Link\]](#)
15. Sain, M.; Panthapulakkal, S.; Bioprocess preparation of wheat straw fibers and their characterization. *Industrial Crops and Products* **2006**, 23, 1. [\[Crossref\]](#)
16. Chisté, R.C.; Mercadante, A. Z.; Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J. L. D.C.; Bragagnolo, N.; *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry* **2011**, 127, 419. [\[Crossref\]](#)
17. Silva, P. I.; Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007. [\[Link\]](#)
18. Bernal, C.; Couto, A. B.; Breviglieri, S. T.; Cavalheiro, É. T. G.; Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais-DSC. *Química Nova* **2002**, 25, 849. [\[Crossref\]](#)
19. Cândido, J. D. C.; Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019. [\[Link\]](#)
20. Laia, A. G.; Dissertação de mestrado, Belo Horizonte: Federal Center for Technological Education of Minas Gerais, 2015. [\[Link\]](#)
21. Zhang, Y.; Liu, J.; Huang, L.; Wang, Z.; Wang, L.; Design and performance of a sericin-alginate interpenetrating network hydrogel for cell and drug delivery. *Scientific Reports* **2015**, 5, 1. [\[Crossref\]](#)
22. Abreu, F. O.; Bianchini, C.; Forte, M. M.; Kist, T. B.; Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling behavior of alginate–chitosan hydrogels. *Carbohydrate Polymer* **2008**, 74, 283. [\[Crossref\]](#)
23. Li, X.; Xie, H.; Lin, J.; Xie, W.; Ma, X.; Characterization and biodegradation of chitosan–alginate polyelectrolyte complexes. *Polymer Degradation and Stability* **2009**, 94, 1. [\[Crossref\]](#)
24. Han, J.; Zhou, Z.; Yin, R.; Yang, D.; Nie, J.; Alginate-chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: preparation and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* **2010**, 46, 199. [\[Crossref\]](#)
25. Pașcalău, V.; Popescu, V.; Popescu, G. L.; Dudescu, M. C.; Borodi, G.; Dinescu, A.; Paul, M.; The alginate/k-carrageenan ratio's influence on the properties of the cross-linked composite films. *Journal of Alloys and Compounds* **2012**, 536, S418. [\[Crossref\]](#)
26. Soares, S.; Camino, G.; Levchik, S.; Comparative study of the thermal decomposition of pure cellulose and pulp paper. *Polymer Degradation and Stability* **1995**, 49, 275. [\[Crossref\]](#)
27. Soares, J. D. P.; Santos, J. E.; Chierice, G. O.; Cavalheiro, E. T. G.; Comportamento térmico do ácido algínico e seu sal de sódio. *Eclética Química* **2004**, 29, 57. [\[Crossref\]](#)
28. Patel, N.; Lalwani, D.; Gollmer, S.; Injeti, E.; Sari, Y.; Nesamony, J.; Development and evaluation of a calcium alginate based oral ceftriaxone sodium formulation. *Progress In Biomaterials* **2016**, 5, 117. [\[Crossref\]](#)
29. Silva, M. C.; Botelho, J. R.; Conceição, M. M.; Lira, B. F.; Coutinho, M. A.; Dias, A. F.; Souza, A. G.; Thermogravimetric investigations on the thermal degradation of bixin, derived from the seeds of annatto (*Bixa orellana L.*). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2005**, 79, 277. [\[Crossref\]](#)
30. Mano, E.; Mendes, C.; *Introdução a Polímeros*. Edgard Bucher LTDA, 2004.
31. Silva, M. I. N.; Trabalho de conclusão de curso, Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, 2015. [\[link\]](#)
32. Pedrosa, M. D. O.; Dissertação de mestrado, Universidade Estadual da Paraíba, 2013. [\[Link\]](#)
33. Oliveira, R. N.; Moreira, A. P.; Thiré, R. M. S. M.; Quilty, B.; Passos, T. M.; Simon, P.; Mancini, M. C.; McGuinness, G. B.; Absorbent Polyvinyl Alcohol/Sodium Carboxymethyl Cellulose Hydrogels for Propolis Delivery in Wound Healing Applications. *Polymer Engineering and Science* **2017**, 57, 1224. [\[Crossref\]](#)
34. Hoffman, A. S.; Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, 64, 18. [\[Crossref\]](#)
35. Barbosa-Filho, J. M.; Silva-Filho, R. N. D.; Lira, B. F.; Macêdo, R. O.; Silva, M. S. D.; Chaves, M. C. D. O.; Athayde-Filho, P. 6F.D.; Teor de bixinha em quatro variedades de *Bixa orellana L.* cultivadas na Paraíba. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **1998**, 7, 41. [\[Crossref\]](#)
36. Golin, S. D.; Garcia, C. E. R.; Barreira, S. M.; Bednarczuk, V. O.; Strapasson, G. C.; Zuchetto, M.; Miguel, O. G.; Concentration of bixin in two varieties of *Bixa orellana L.* Cultured in Paraná. *Visão Acadêmica* **2013**, 14, 4. [\[Crossref\]](#)
37. Takamoto, R. T. O.; Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2015. [\[link\]](#)
38. William, D. C. J.; Callister, J. R.; *Ciência e Engenharia de Materiais—Uma Introdução*, 5a ed. Editora LTC—Livros Técnicos e Científicos, São Paulo, 2002.