

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ANA PAULA MOSCARDINI LOPES

PREPARAÇÃO DE MICROGÉIS RESPONSIVOS À BASE DE GELATINA

Porto Alegre, 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ANA PAULA MOSCARDINI LOPES

PREPARAÇÃO DE MICROGÉIS RESPONSIVOS À BASE DE GELATINA

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do curso de Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção do grau de Químico Industrial.

Orientadora: Prof.^a Nádyá Pesce da Silveira

Porto Alegre, 2019.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof.^a Nádyá Pesce da Silveira, por todos os ensinamentos, pela confiança depositada no meu trabalho, pela paciência e disponibilidade.

Aos meus pais, por todo o incentivo, apoio e suporte para que eu concluísse o curso.

Agradeço também aos meus ex-colegas do LAPOL, pela amizade e por todos os bons momentos de convívio no laboratório.

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo a preparação de microgéis à base de gelatina, que sejam responsivos ao pH e temperatura. Foram preparadas quatro amostras a partir de uma mistura de gelatina e ácido hialurônico, na concentração de 3mg.mL^{-1} , dispersos em uma solução preparada de água ultrapura e etanol, na proporção 1:1 v/v. As soluções iniciais foram colocadas em agitação em agitador mecânico por 40 minutos, em temperaturas baixas. A velocidade de agitação variou entre 500 e 2000 rpm a fim de avaliar a influência da velocidade de agitação no tamanho dos microgéis formados. Durante a agitação foi gotejada uma solução aquosa do reticulante 1-etil (3,3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) na quantidade de $18\text{Mm } 2\text{mL.min}^{-1}$. Os sistemas foram caracterizados por Espalhamento de Luz Dinâmico, Microscopia Confocal, análise de Potencial Zeta e Análise Térmica. Pela técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico obteve-se tamanhos nanométricos, e pela técnica de Microscopia Confocal foram obtidos os maiores tamanhos, entre 1 e $30\mu\text{m}$.

Palavras-chave: Microgéis. Gelatina. Reticulação Química.

ABSTRACT

The present work aims to prepare gelatin-based microgels that are responsive to pH and temperature. Four samples were prepared from a mixture of gelatin and hyaluronic acid, at a concentration of 3mg. mL^{-1} , dispersed in a prepared solution of ultrapure water and ethanol, in the ratio 1:1 v / v. The starting solutions were stirred on a mechanical shaker for 40 minutes at low temperatures. The stirring speed varied between 500 and 2000 rpms in order to evaluate the influence of the stirring speed on the size of the formed microgels. During stirring an aqueous solution of the 1-ethyl (3,3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) crosslinker was dripped in the amount of $18\text{Mm } 2\text{mL.min}^{-1}$. The systems were characterized by Dynamic Light Scattering, Confocal Microscopy, Zeta Potential Analysis and Thermal Analysis. By the Dynamic Light Scattering technique, nanometric sizes were obtained, and by the Confocal Microscopy technique, the largest sizes were obtained, between 1 and $30\mu\text{m}$.

Keywords: Microgels. Gelatine. Chemical crosslinking

LISTA DE ABREVIATURAS

AH – Ácido hialurônico

DLS – Dynamic Light Scattering - Espalhamento dinâmico de luz

DSC- Differential Scanning Calorimetry - Calorimetria exploratória diferencial

EDC - 1-etil (3,3-dimetilaminopropil) carbodiimida

PZ – Potencial Zeta

rpm – Rotações por minuto

Tg- temperatura de transição vítrea

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estrutura primária, secundária e terciária do colágeno | 12 |
| Figura 2 – Fórmula molecular da unidade dissacarídica do ácido hialurônico, formada por ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetilglicosamina (GlcNAc) | 13 |
| Figura 3 – Esquema do processo de reticulação da gelatina com o EDC | 14 |
| Figura 4 – Termograma de DSC da primeira curva de aquecimento das 4 amostras..... | 21 |
| Figura 5 – Termograma de DSC para a segunda curva de aquecimento para as 4 amostras .. | 22 |
| Figura 6 – Imagens de microscopia confocal das amostras AP1 (a) e AP2 (b) | 23 |
| Figura 7 – Imagens de microscopia confocal das amostras AP3 (c) e AP4 (d) | 23 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Esquema da metodologia utilizada para a preparação dos microgéis | 17 |
| Tabela 2 - Dados relativos aos tamanhos de partículas e potencial zeta | 20 |
| Tabela 3 - Custos de solventes e reagentes utilizados para a preparação de 4 amostras | 24 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. ESTADO DA ARTE | 11 |
| 2.1 Hidrogel | 11 |
| 2.2 Gelatina | 12 |
| 2.3 Ácido hialurônico | 13 |
| 2.4 Reticulante | 14 |
| 3. OBJETIVOS | 15 |
| 3.1 Objetivos específicos | 15 |
| 4. PROPOSTA TECNOLÓGICA | 16 |
| 5. METODOLOGIA | 17 |
| 5.1 Obtenção do microgel | 17 |
| 5.2 Técnicas de caracterização | 18 |
| 5.2.1 Espalhamento de Luz Dinâmico | 18 |
| 5.2.2 Potencial Zeta | 18 |
| 5.2.3 Microscopia Confocal | 18 |
| 5.2.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) | 19 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 20 |
| 6.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (PZ) | 19 |
| 6.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) | 20 |
| 6.3 Microscopia Confocal | 22 |
| 7. RELAÇÃO DOS CUSTOS | 24 |
| 8. CONCLUSÕES | 25 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 26 |

1. INTRODUÇÃO

Compostos à base de polímeros naturais tem sido alvo de muitas pesquisas recentes devido à preocupação com o meio ambiente. Os polímeros naturais são materiais de baixa toxicidade, biodegradáveis, de baixo custo e que podem ter algumas propriedades físico-químicas modificadas. Os polímeros naturais são biocompatíveis, ou seja, podem ser potencialmente utilizados no corpo humano após testes *in vivo*. Destaca-se a gelatina, um polímero natural e biocompatível, uma mistura de polipeptídios, que possui grupos funcionais como OH, COOH e NH₂ que podem ligar-se a moléculas de água, formando uma rede tridimensional a qual pode ser facilmente reticulada formando um hidrogel. Os materiais produzidos a partir de biopolímeros possuem uma ampla gama de aplicação em indústrias alimentícias, agrícolas e farmacêuticas. As propriedades físicas e químicas dos hidrogéis são muito semelhantes às dos tecidos vivos, por esse motivo estes são muito utilizados na biomedicina devido às suas semelhanças bioquímicas com componentes da matriz extracelular. As aplicações biomédicas utilizadas atualmente incluem polímeros naturais, sintéticos e hidrogéis compostos de polímeros naturais e sintéticos. Neste trabalho, foram estudados hidrogéis a base de gelatina a partir de uma metodologia já utilizada anteriormente na preparação de matrizes para cultura de células. Como os hidrogéis foram preparados em emulsão, os mesmos podem ser denominados de microgéis.

2. ESTADO DA ARTE

2.1 Hidrogel

Os hidrogéis são formados por polímeros tridimensionais reticulados capazes de absorver grande quantidade de solvente (água) na sua estrutura, sem perder sua estabilidade dimensional. Os mesmos possuem caráter hidrofílico devido a presença de grupos polares na cadeia polimérica, tais como COOH, OH, CONH₂, CONH, SO₃H. Podem ser obtidos por reticulação química ou física. Na reticulação química são adicionados agentes reticulantes que reagem com grupos específicos da cadeia polimérica.

Os hidrogéis podem ser classificados como microgéis quando são preparados de forma a possuir tamanhos micrométricos ou nanométricos. Os microgéis podem ser responsivos, ou seja, responder a estímulos, como temperatura ou pH.

Hidrogéis de polímeros naturais tem sido muito estudado pois polímeros naturais são compostos por moléculas que estão presentes na matriz celular, ou seja são biocompatíveis com as células. (VELEMA E KAPLAN,2006). Atualmente é crescente a busca por esse tipo de material, por possuir uma ampla gama de aplicação como biomateriais. Os mesmos atuam na liberação controlada de fármacos, são utilizados na produção de lentes de contato e como substratos para a engenharia de tecidos, principalmente pela capacidade de reagir a estímulos externos e mimetizar tecidos biológicos. (BUENO,2010).

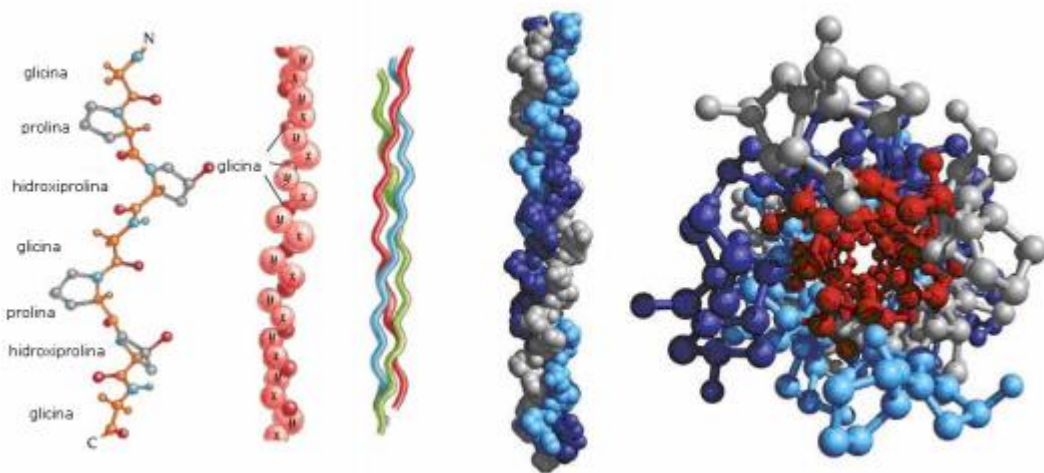
Há trabalhos na literatura com uso de hidrogéis: Fatemeh Hassani e colaboradores, testaram hidrogéis de quitosana na cultura de folicos pré-antrais de camundongos, e os resultados mostraram que o hidrogel foi benéfico no encapsulamento de folículo ovariano.

2.2. Gelatina

A gelatina é sintetizada a partir de hidrólise do colágeno que pode ser extraído da pele do porco, de ossos de bovinos, aves e peixes. (GMIA,2012). Possui caráter anfótero em solução aquosa, sendo capaz de atuar como ácido ou base, dependendo do pH do meio.

A gelatina bovina é composta majoritariamente por aminoácidos não polares (glicina, alanina, prolina, valina, leucina) e aminoácidos carregados positivamente (lisina, arginina, histidina) e carregados negativamente (aspartato e glutamato) (GMIA, 2012). Os aminoácidos estão unidos por uma ligação covalente denominada ligação peptídica. O interesse da gelatina na área farmacêutica vem crescendo nos últimos anos (FERREIRA, 2013). Devido a gelatina ser um polímero natural, biocompatível e principalmente biodegradável e de baixo custo. A mesma pode ser preparada em forma de filmes, membranas, capsulas ou micro e nanopartículas. A gelatina possui estrutura helicoidal e quando uma solução de gelatina é resfriada ela retoma sua estrutura de tripla hélice e forma um hidrogel, pois há a formação de ligações de hidrogênio com os grupos CO e NH. A gelatina é muito solúvel em água, dessa forma é necessário fazer a reticulação das cadeias para diminuir a sua solubilidade e utilizá-la como hidrogel.

Figura 1. Estrutura primária, secundária e terciária do colágeno.



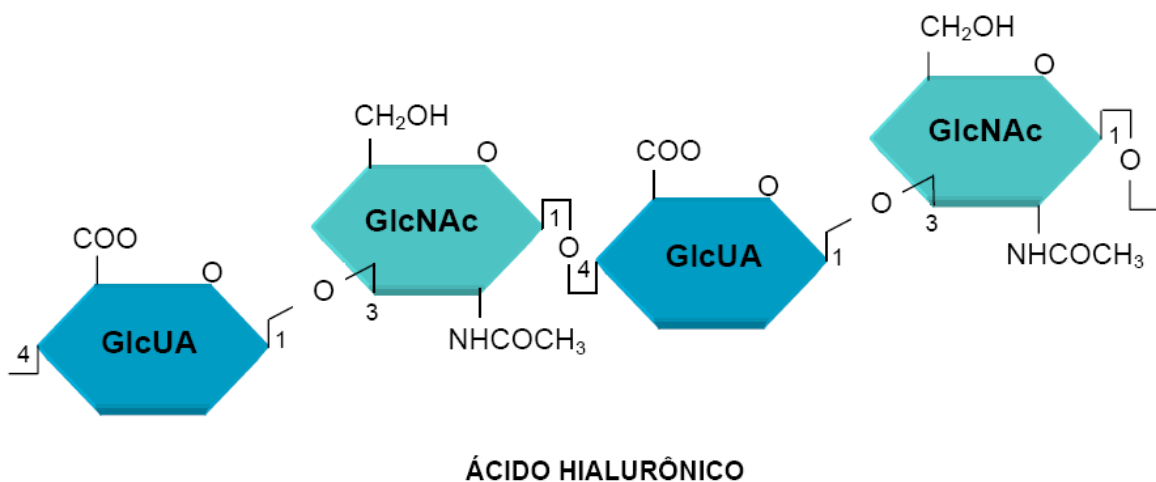
Fonte: (PORTO,2007)

2.3. Ácido hialurônico

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo que está presente na matriz intracelular dos vegetais, nos tecidos e fluidos dos animais vertebrados e algumas bactérias. Tem como principal função estabilizar a estrutura da membrana extracelular com as superfícies das células. (FRASER 1997).

O AH é classificado como glicosaminoglicano, é composto por unidades dissacarídicas repetidas contendo N-acetilglicosamima e ácido D-glicurônico (Figura 2), sua cadeia polimérica pode atingir altas massas molares. (OGRODOWSKI, 2006) O AH possui vários grupos que podem ser modificados, como os grupos carboxílico, hidroxílico, acetamida e no terminal reduzido do polímero através de reações de esterificação, reações mediadas por carbodiimidias, acilação, entre outras. Dentre os hidrogéis aplicáveis na engenharia de tecidos, o AH se destaca por ser um polímero biodegradável e biocompatível (está presente na matriz extracelular nativa) e tem sido muito utilizado como sistema para encapsulação e liberação controlada de fármacos.

Figura 2. Fórmula molecular da unidade dissacarídica do ácido hialurônico, formada por ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetilglicosamina (GlcNAc).

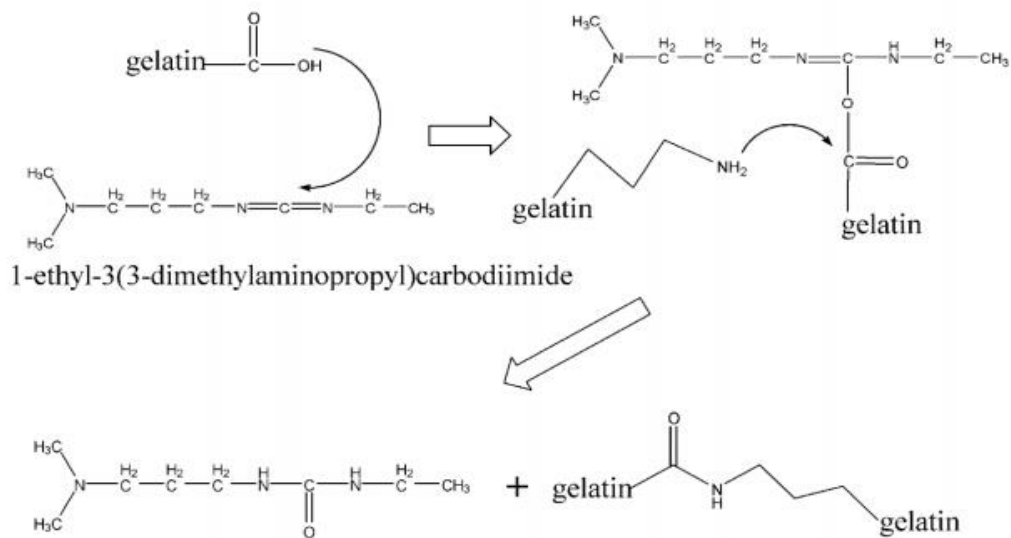


Fonte: (OGRODOWSKI, 2006)

2.4. Reticulação química

No processo de reticulação química são formadas ligações cruzadas entre as moléculas, alterando suas propriedades, como estabilidade térmica e solubilidade e tornando o material insolúvel. O EDC (1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) tem sido muito utilizado como reticulante em filmes obtidos a partir de proteínas e polissacarídeos. Uma vantagem deste agente reticulante em comparação a outros reticulantes como o formaldeído e glutaraldeído é que o EDC não é considerado tóxico. O EDC induz a formação de ligações covalentes com polissacarídeos tendo como subproduto um derivado da ureia que é solúvel em água e pode ser facilmente removida. (TOMIHATA,1993) A figura 3 mostra esquematicamente como o reticulante se liga quimicamente na gelatina. O EDC deve atacar da mesma forma o ácido hialurônico, uma vez que este possui grupamentos carboxílicos disponíveis (Figura 2). Espera-se a ocorrência de ligações cruzadas (gelatina + ácido hialurônico) dando origem a uma rede tridimensional (hidrogel).

Figura 3. Esquema do processo de reticulação da gelatina com o EDC.



Fonte: (CRISTIANO, C.M.Z., 2009)

3. OBJETIVOS

Este projeto tecnológico tem por objetivo preparar microgéis de polímeros biocompatíveis (gelatina e ácido hialurônico), responsivos ao pH e temperatura, e analisar algumas de suas propriedades físico-químicas.

3.1 Objetivos Específicos

- I. Avaliar a influência da velocidade de rotação durante a reticulação química, no tamanho das partículas formadas (microgéis).
- II. Analisar as propriedades físico-químicas dos microgéis e sua estabilidade.

4. PROPOSTA TECNOLÓGICA

Este trabalho tem como proposta tecnológica a preparação de hidrogéis de gelatina e ácido hialurônico, um método já utilizado em outro estudo do laboratório para a preparação da matriz para cultura de células. Utilizou-se um agente reticulante não tóxico, o 1-etil (3,3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), que permite uma reticulação cruzada entre as macromoléculas de polímero, liberando um subproduto derivado da ureia, que pode ser facilmente removido por lavagem. Visto que a gelatina e o ácido hialurônico são polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, podem ser usados na área biomédica. Atualmente a busca por dispersões coloidais estáveis torna crescente a necessidade de se estudar métodos de preparação inovadores e atóxicos. Assim o presente trabalho visou avaliar as propriedades e estabilidade dos hidrogéis à base de gelatina e ácido hialurônico, obtendo partículas estáveis com diâmetros nano e micrométricos, de forma simples e reprodutiva e com baixo custo laboratorial.

5. METODOLOGIA

5.1 Obtenção do microgel

Inicialmente pesou-se 540mg de gelatina e 60mg de ácido hialurônico. Essa mistura foi dispersa em 200mL de uma solução de água e etanol 1:1 v/v, tendo sido o sistema dividido em 4 amostras de 50mL. Cada uma das amostras foi colocada em agitação, em ultra-turrax, por 40 minutos, sob banho de gelo. Durante a agitação foi gotejada uma alíquota de 25mL de uma solução do reticulante 1-etil (3,3 dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (18Mm), a uma velocidade de 2mL.min⁻¹. Para cada amostra foi aplicada uma diferente velocidade de agitação, como mostra a tabela 1, afim de se estudar a influência da velocidade de preparação no tamanho das partículas (microgéis).

Tabela 1. Esquema da metodologia utilizada para a preparação dos microgéis.

| Mistura (AP1) | Mistura (AP2) | Mistura (AP3) | Mistura (AP4) |
|---|---|--|--|
| 50 mL de gelatina + ácido hialurônico em água/etanol + 25 mL de EDC, 40 min em agitação 500rpm. | 50 mL de gelatina + ácido hialurônico em água/etanol + 25mL de EDC, 40 min em agitação 1000rpm. | 50 mL de Gelatina + ácido hialurônico em água/etanol + 25mL de EDC, 40 min em agitação 1500 rpm. | 50 mL de gelatina + ácido hialurônico em água/etanol +25mL de EDC, 40 min em agitação 2000rpm. |

5.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

5.2.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Também chamado de espectroscopia de correlação de fótons (PCS) ou espalhamento de luz quasi-elástico (QELS), o DLS é utilizado para detectar flutuações temporais na intensidade de luz espalhada por partículas ou moléculas em solução devido ao movimento Browniano. Quando uma partícula é iluminada por uma fonte de luz, como um laser, ela irá espalhar luz em todas as direções. Para amostras monodispersas, e diluídas, é possível extrair o coeficiente de difusão translacional da partícula, D_T .

Caso as partículas possam ser assumidas esfericamente simétricas e não permeáveis ao solvente (por exemplo, proteínas globulares, outros polímeros e vesículas lipídicas em suspensão) usa-se a equação de Stokes-Einstein para o cálculo do diâmetro efetivo (D_{ef}) ou hidrodinâmico, das partículas em equilíbrio térmico com o solvente:

$$D_{ef} = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_T}$$

5.2.2 Potencial Zeta

Esta técnica permite determinar o potencial superficial das partículas. O potencial superficial recobre a partícula, e indica a estabilidade coloidal: quanto maior o valor das cargas em módulo, maior a repulsão eletrostática e menor será a probabilidade de agregação, floculação ou sedimentação (ALBERNAZ,2014). Para a determinação do potencial zeta utilizou-se o equipamento ZETA Potential Brookhaven. Foi utilizado cerca de 10mL de amostra, com pH 5, na temperatura de 25°C.

5.2.3 Microscopia Confocal

A microscopia confocal baseia-se na iluminação por varredura a laser, ponto-a-ponto, de um espécime normalmente tratado ou marcado com compostos fluorescentes. Para análise das amostras foi utilizado o equipamento FV1000. Neste caso não foi necessário o uso de marcador fluorescente pois as amostras apresentaram fluorescência intrínseca em 485nm. Foi gotejada uma pequena quantidade das amostras em lamínulas e deixado secar por 24h para posterior análise.

5.2.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Na análise de DSC a amostra e a referência são aquecidas a uma taxa constante. Esta técnica pode ser definida como uma análise em que a medida da taxa de fluxo de calor para uma amostra é descrita em função da temperatura ou tempo. É possível acompanhar eventos como a fusão, ebulição, sublimação, congelamento, inversões de estruturas cristalinas, ou reações de desidratação e decomposição capazes de causar variações de temperatura entre a amostra e a referência (IONASHIRO,2004). As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análise Térmica (LAMAT) em um equipamento DSC Q2000 TA Instruments. Utilizou-se como atmosfera inerte o gás nitrogênio, com uma vazão de $50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (PZ)

As 4 amostras (AP1, AP2, AP3, AP4) foram analisadas por espalhamento de luz e potencial zeta, para verificar os tamanhos das partículas e a estabilidade dos sistemas, respectivamente. Os dados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Dados relativos aos tamanhos de partículas e potencial zeta.

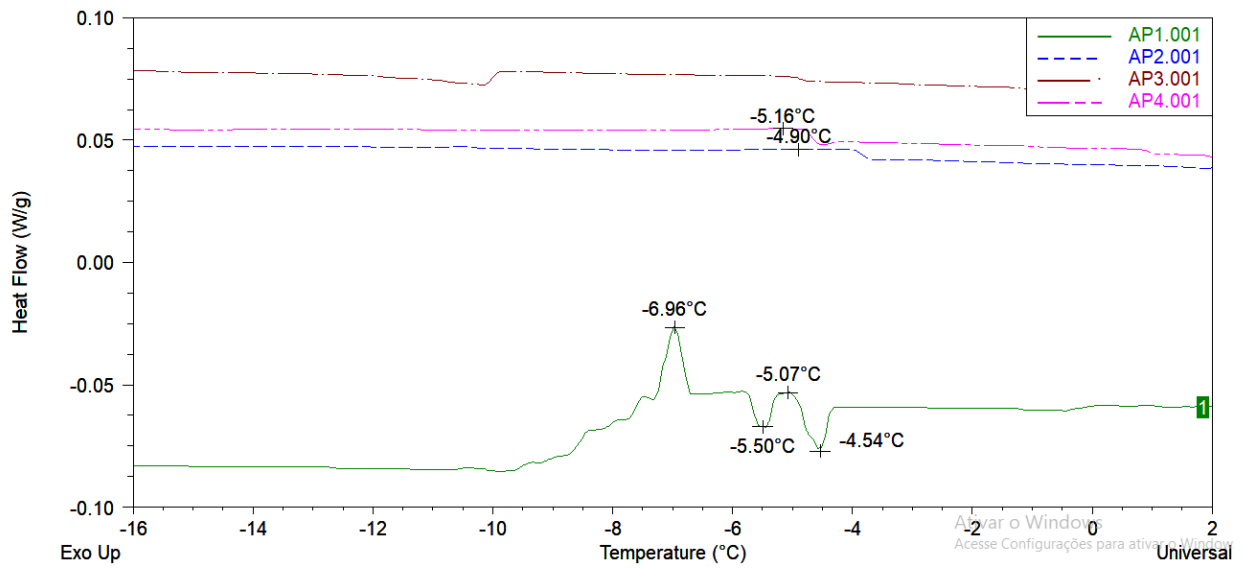
| Amostra | Velocidade de rotação (rpm) | Diâmetro (nm) | Potencial Zeta (ev) |
|----------------|--|--------------------------|--------------------------------|
| AP1 | 500 | 208,5 | -1,20 |
| AP2 | 1000 | 242,0 | -14,33 |
| AP3 | 1500 | 288,8 | -7,85 |
| AP4 | 2000 | 292,4 | +0,83 |

É possível observar que as amostras que foram preparadas com maiores velocidades de rotação resultaram em tamanhos maiores. Provavelmente isto ocorre devido a aglomeração de partículas durante a reticulação. Na análise do potencial zeta foram obtidos potenciais negativos e positivos, pois o meio contém grupos positivos e negativos, tais como ácidos carboxílicos e aminas nas amostras em que foram predominantes os grupos aniônicos. O potencial zeta também está relacionado com a estabilidade das partículas. É possível observar que a amostra que foi exposta a uma maior velocidade de rotação apresentou um menor potencial em módulo e, portanto, maior chance de se aglomerar. A amostra AP2 apresentou uma maior estabilidade, de acordo com a análise do potencial zeta.

6.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

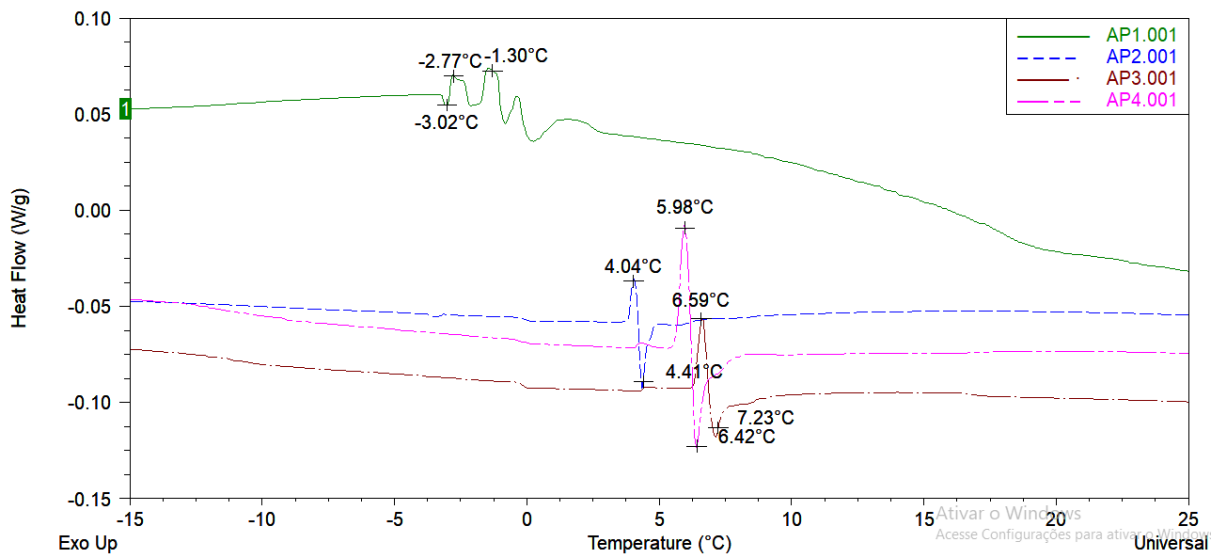
A análise de DSC foi realizada principalmente para determinação da temperatura de fusão e cristalização das amostras estudadas. Os termogramas estão apresentados na Figura 4.

Figura 4. Termograma de DSC da primeira curva de aquecimento das 4 amostras.



Para a primeira amostra (AP1) verificou-se uma transição de fase em aproximadamente $-4,54\text{ }^{\circ}\text{C}$ e também a formação de cristais ($-6,96\text{ }^{\circ}\text{C}$). As demais amostras não apresentaram transição de fase. As amostras AP2 E AP4 apresentaram uma Tg em aproximadamente $-4,90\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-5,16\text{ }^{\circ}\text{C}$ respectivamente, ou seja, elas adquiriram mobilidade na cadeia a partir destas temperaturas.

Figura 5. Termograma de DSC para a segunda curva de aquecimento para as 4 amostras.



Na segunda curva de aquecimento a amostra AP1 apresentou várias fusões e cristalizações, pois ainda não havia sido totalmente cristalizada no primeiro aquecimento, provavelmente devido à presença de água e etanol, o que leva a uma modificação nas propriedades coligativas. Na amostra que não havia cristalizado na primeira curva, formou-se um cristal em 4,04 °C e observou-se uma fusão em 4,41°C. As amostras AP3 e AP4 também cristalizaram e fundiram em temperaturas muitas próximas e positivas. Foi observado que as partículas maiores demoraram mais para fundir/cristalizar, como esperado. Como as amostras contêm moléculas de água, etanol, e partículas aglomeradas, essas estruturas interferem na formação de cristais e a água necessita mais tempo para fundir.

6.3 Microscopia Confocal

As figuras 6 e 7 apresentam as imagens obtidas no microscópio confocal. As amostras apresentaram autofluorescência em 485 nm, de forma que foi possível obter imagens dos microgéis sem excitação artificial. Atribui-se a fluorescência intrínseca dos microgéis à estrutura helicoidal típica da gelatina, que foi em parte preservada durante a preparação das partículas.

Figura 6. Imagens de microscopia confocal das amostras AP1 (a) e AP2 (b).

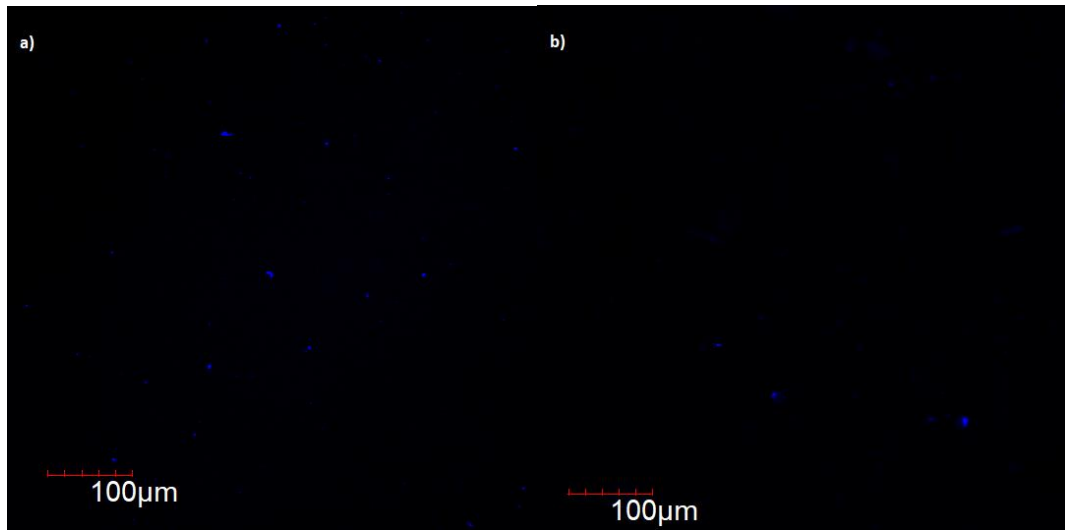
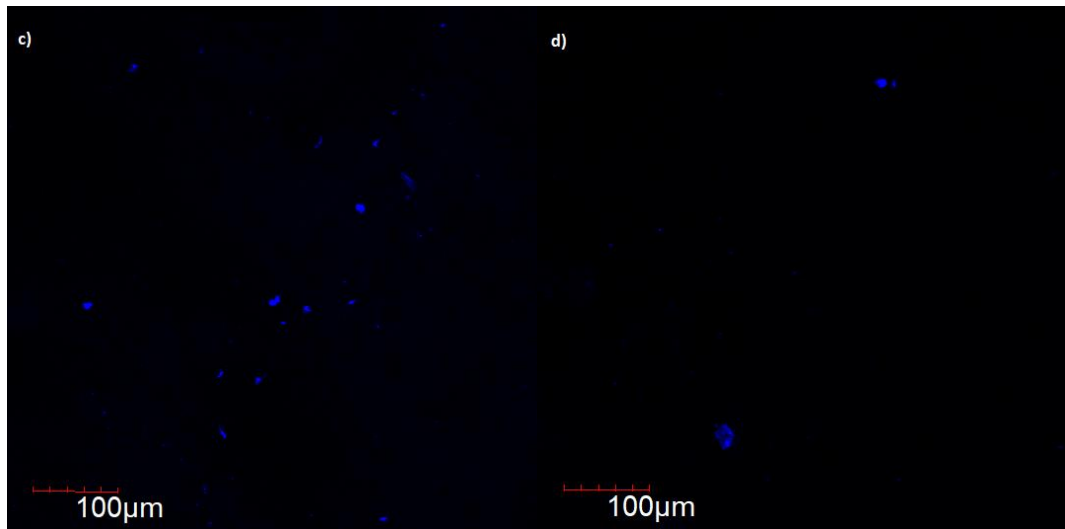


Figura 7. Imagens de microscopia confocal das amostras AP3 (C) e AP4 (D).



Através da microscopia confocal foram detectadas as partículas de maior tamanho (micrométricas). As amostras AP3 e AP4, que apresentaram as maiores nanopartículas (tamanhos obtidos por DLS) também apresentaram tamanhos maiores na microscopia confocal. As micropartículas possuem diâmetros entre 10 e 30 μm . Nas amostras AP1 e AP2 foram observados tamanhos entre 1 e 10 μm .

7. RELAÇÃO DE CUSTOS DE PRODUÇÃO

Foram avaliados os custos, para a produção em escala laboratorial, das 4 amostras de microgéis. Foram descritos os custos com solventes e reagentes, exceto a água ultrapura utilizada. Não foram considerados os custos com energia elétrica gasta no tempo de preparo, os custos dos equipamentos e mão de obra do bolsista, pois foram considerados como custos básicos em um laboratório.

Tabela 3. Custos de solventes e reagentes utilizados para a preparação de 4 amostras.

| Reagentes/solventes | Quantidade utilizada | Valor (R\$) |
|---------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| Etanol | 100 mL | 4,00 |
| Gelatina | 540 mg | 0,071 |
| Ácido hialurônico | 60 mg | 16,14 |
| Reticulante (EDC) | 1,035g | 71,21 |
| Custo total (4 amostras) | | 91,42 |
| Custo por amostra | | 22,86* |

*Para 75 mL de amostra

Os custos foram calculados com base nos reagentes e solventes utilizados para a preparação em laboratório; em escala industrial espera-se que o custo dos produtos seja consideravelmente reduzido, tornando viável a preparação dos microgéis em escala industrial.

8. CONCLUSÕES

- Foi possível a preparação de microgéis de gelatina com tamanhos variáveis, dependendo da velocidade de agitação durante a preparação.
- Pode-se caracterizar uma população nanométrica, com tamanhos variando entre 200 e 300 nm de diâmetro, através da técnica de espalhamento de luz.
- Através da microscopia confocal foi possível constatar que os microgéis possuem fluorescência intrínseca, e com isso foi possível observar partículas com tamanho entre 1 e 30 µm, dependendo da amostra.
- As amostras preparadas com velocidade de agitação a partir de 1000 rpm mostraram-se similares e mais estáveis termicamente, conforme determinado por calorimetria.
- A análise do potencial zeta avaliou a estabilidade dos sistemas, podendo-se concluir que o sistema AP2 (1000 rpm) possui uma maior estabilidade coloidal.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERNAZ, Vanessa Lima. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização fisicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico.** Universidade de Brasília, [s. l.], 2014.

BUENO, V. A.B., **Produção de Hidrogéis micro e nano estruturados**, Tese de Doutorado, USP. São Paulo. 2010.

CRISTIANO C.M.Z **Blendas formadas por caseína e gelatina: efeito da adição plastificante e de agente reticulante e interações com copolímeros.** Tese de Doutorado em Química, Departamento de química Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 2009

FERREIRA, Mirele Fernandes. **Extração e caracterização de gelatina proveniente de subprodutos de frango: PÉS.** 2013. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2013.

FRASER, J. R. E.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. G. Hyaluronan: its nature distribution, functions and turnover. **J. intern med.**, v. 242, p. 27-33, 1997. ISSN 1.

GMIA (Gelatin Manufacturers Institute of America), **Gelatin Handbook**, America, pp.1-25, 2012.

HASSANI F, EBRAHIMI B, MOINI A, GHIASEDDIN A, BAZRAFKAN M, HASSANZADEH GH, VALOJERDI MR. Chitosan hydrogel supports integrity of ovarian follicles during in vitro culture: a preliminary of a novel biomaterial for three dimensional culture of ovarian follicles. **Cell Journal.** , v.21, 2019.

IONASHIRO, M. G. Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. **Giz, editorial**, São Paulo, p. 82, 2004.

OGRODOWSKI, Christiane Saraiva. **Produção de ácido hialurônico por streptococcus**, Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.

PORTO, Ledilege Cucco. **Filme formados por gelatina e poli(acrilamida-co-ácido acrílico);efeito da composição, do plastificante e agente reticulante nas propriedades térmicas, mecânicas e absorção de água**, Dissertação de mestrado, Universidade federal de Santa Catarina, 2007

TOMEDI, J. **desenvolvimento de matriz extracelular temporária para gênese de mucosa urotelial**. (2011). 96f. Dissertação (Mestrado em ciência dos Materiais) - IQ, UFRGS, Porto Alegre.

TOMIHATA, K. Cross-linking and biodegradation of native and denatured collagen. **polymers of biomefical significance**, n. 24, p. 275-286, 1993.

VELEMA, J. . K. D. Biopolymer-based biomaterials as scaffolds for tissue engineering. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 102, p. 187-238, janeiro 2006.